Année scolaire
1977-1978

N° d'ordre : 8

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par Françoise SIRIEIX

Pharmacien

Assistant à l'U.E.R. de Pharmacie de Bordeaux II

Ancien Interne, Attaché des Hôpitaux de Bordeaux

née le 1er octobre 1945 à Tulle (Corrèze)

1ere Thèse : Contribution à l'étude du dosage du cholestérol par spectrophotocolorimétrie (réaction de Liebermann-Burchard) et par spectrofluorescence (réactions de Liebermann-Burchard et de Zak).

2e Thèse : Contribution à l'étude de divers constituants de l'humeur aqueuse

Présentées et Soutenues publiquement le mardi 20 décembre 1977
devant la Commission d'Examen

M. R. CROCKETT	Professeur	Président
M. Cl. VRIGNAUD	Professeur	Juges
M. E. JOUZIER	Maître de Conférences Agrégé	

Éditions Bergeret, - BORDEAUX

Année scolaire
1977-1978

N° d'ordre : 8

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par Françoise SIRIEIX

Pharmacien

Assistant à l'U.E.R. de Pharmacie de Bordeaux II

Ancien Interne, Attaché des Hôpitaux de Bordeaux

née le 1er octobre 1945 à Tulle (Corrèze)

1ere Thèse : Contribution à l'étude du dosage du cholestérol par spectrophotocolorimétrie (réaction de Liebermann-Burchard) et par spectrofluorescence (réactions de Liebermann-Burchard et de Zak).

2e Thèse : Contribution à l'étude de divers constituants de l'humeur aqueuse

Présentées et Soutenues publiquement le mardi 20 décembre 1977
devant la Commission d'Examen

M. R. CROCKETT	Professeur	Président
M. Cl. VRIGNAUD	Professeur	Juges
M. E. JOUZIER	Maître de Conférences Agrégé	Juges

Éditions Bergeret, - BORDEAUX

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A LA MEMOIRE DE MA GRAND-MERE PATERNELLE

C'est à toi mémé mamy que je dédie ce travail.

A MES GRANDS-PARENTS MATERNELS

Avec ma reconnaissance et mon grand attachement.

A MES PARENTS

Avec toute mon affection.

A MON FRERE ET A MA SOEUR

Que demeure entre nous cette étroite complicité.

A BERNARD

Un grand merci.

A MES AMIS

A L'ENSEMBLE DU PERSONNEL du Laboratoire de BIOCHIMIE PHARMACEUTIQUE et du Laboratoire de BIOCHIMIE de l'Hôpital PELLEGRIN.

A Madame le Professeur S. ARGILAS-LARCEBAU

A Monsieur le Professeur J. MARQUEVIELLE

Je vous remercie d'avoir bien voulu accepter de former le comité de lecture. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie également Monsieur le Professeur ROQUES d'avoir si aimablement réalisé les calculs statistiques de ce travail.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur E. JOUZIER

Directeur Adjoint de l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
Ancien Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Bordeaux
Licencié ès-Sciences
Maître de Conférences Agrégé de Chimie Biologique

Vos conseils pour la rédaction de ce travail m'ont été très utiles. Je vous remercie d'accepter de le juger.

Monsieur le Professeur C. VRIGNAUD

Professeur sans chaire (Physique Pharmaceutique)
Licencié ès-Sciences

Nous connaissons vos compétences en matière de Biophysique. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Directeur de l'U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques
Professeur titulaire à titre personnel
de Biochimie Pharmaceutique
Licencié ès-Sciences
Ancien Interne en Pharmacie des Hôpitaux
de Bordeaux
Médaille d'Or de l'Internat
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Chevalier des Palmes Académiques

Au cours de mes années d'internat vous m'avez fait partager votre enthousiasme pour tout ce qui a trait à la Biochimie Clinique.
Vous avez inspiré et guidé ce travail au cours duquel j'ai bénéficié de vos compétences sur le plan expérimental, profité de la clarté de votre raisonnement et de vos conseils judicieux pour sa rédaction.

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Qu'il me soit permis de vous exprimer ma grande admiration, ma profonde reconnaissance et mon sincère attachement.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU DOSAGE DU CHOLESTÉROL PAR SPECTROPHOTOCOLORIMÉTRIE (RÉACTION DE LIEBERMANN - BURCHARD) ET PAR SPECTROFLUORESCENCE (RÉACTION DE LIEBERMANN-BURCHARD ET RÉACTION DE ZAK)

*

Françoise SIRIEX

Pharmacien
Assistant à l'UER de Pharmacie Bordeaux II
Ancien Interne, Attaché des Hôpitaux de Bordeaux
Certificat d'Etudes Supérieures de Chimie organique
Certificat d'Etudes Supérieures de Chimie générale
Certificat d'Etudes Supérieures de Biochimie dynamique et analytique
Certificat d'Etudes Supérieures de Toxicologie et d'Hygiène industrielle
Certificat d'Etudes Supérieures de Pathologie médicale
Certificat d'Etudes Spéciales de Biochimie pharmaceutique et technique
Certificat d'Etudes Spéciales d'Hématologie

S O M M A I R E

Pages

INTRODUCTION. 3

PREMIERE PARTIE :

CLASSIFICATION DES MÉTHODES DE DOSAGE DU CHOLESTÉROL. 7

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE DE L'INFLUENCE DES SOLVANTS ET DES ACIDES ARYLSULFONIQUES DANS LA REACTION DE LIEBERMANN - BURCHARD. ... 45

- INTRODUCTION,
- CHAPITRE I : ETUDE DE L'INFLUENCE DES SOLVANTS. 49
- CHAPITRE II : ETUDE DE L'INFLUENCE DES ACIDES ARYLSULFONIQUES. 101

TROISIEME PARTIE:

ETUDE DE L'INTERFERENCE DE LA BILIRUBINE DANS LA REACTION DE LIEBERMANN - BURCHARD EN VOIE DIRECTE. 123

QUATRIEME PARTIE:

ETUDE ANALYTIQUE DES REACTIONS DE LIEBERMANN - BURCHARD, SALKOWSKI et ZAK EN SPECTROFLUORESCENCE. 165

CINQUIEME PARTIE:

APPLICATIONS DE LA SPECTROFLUORESCENCE A LA DETERMINATION DU CHOLESTEROL DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES.

LIMITES DE SPECIFICITE DE LA METHODE FLUORIMETRIQUE. ... 239

Pages

- CHAPITRE I : APPLICATIONS DE LA SPECTROFLUORESCENCE A LA DETERMINATION DU CHOLESTEROL DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES. 241

- CHAPITRE II : LIMITES DE SPECIFICITE DE LA METHODE FLUORIMETRIQUE. 259

CONCLUSION. 269

--oOo--

I N T R O D U C T I O N

Le cholestérol occupe une place privilégiée dans le métabolisme lipidique. La cholestérolémie constitue en effet un des critères fondamentaux de la classification des hyperlipoprotéinémies et joue un rôle important dans les facteurs de risque de l'athérosclérose.

Sa détermination dans les liquides biologiques et plus particulièrement dans le sérum, présente un double intérêt :

- diagnostique dans les hyperlipoprotéinémies permettant la mise en œuvre d'une thérapeutique appropriée,
- préventif voire pathogénique dans l'athérosclérose.

Il y a quelques années, le biochimiste disposait des seules méthodes colorimétriques pour doser le cholestérol. Sans négliger certains de leurs avantages, ces techniques présentent des inconvénients tant sur le plan de la spécificité et de la sensibilité que sur celui de la valeur pratique. A l'heure actuelle, l'apparition de méthodes de dosage par voie enzymatique et le développement de méthodes instrumentales hautement perfectionnées permettent de résoudre les problèmes posés par les méthodes colorimétriques.

Dans le choix d'une méthode de dosage, l'analyste est guidé par des critères de qualité exigibles en fonction du but poursuivi :

- Pour la détermination du cholestérol sérique, effectuée en série, spécificité, reproductibilité et valeur pratique constituent les critères essentiels.

- Lors des expérimentations à visée thérapeutique chez l'homme ou pathogénique chez l'animal, en plus des critères précédents, l'aspect sensibilité ne doit pas être négligé.

- Enfin, pour la détermination du cholestérol dans divers milieux biologiques (liquide céphalo-rachidien, liquide amniotique, humeur aqueuse), ce sont surtout les critères de spécificité et de sensibilité qui doivent être pris en compte.

Guidé par ces critères, ce travail a un double but :

1.- Tenter de préciser quelques points encore assez mal étudiés de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD :

. sur le plan théorique, l'influence des solvants sur le développement de la réaction colorée et l'utilité ou l'inutilité de l'adjonction des acides benzène-sulfoniques ;

. sur le plan pratique, l'élimination des interférences, en particulier celle de la bilirubine, afin d'améliorer la spécificité de la réaction.

2.- Essayer d'approfondir, développer et perfectionner une méthodologie assez peu exploitée à ce jour pour le dosage du cholestérol : la fluorométrie. Grâce à celle-ci en effet, le seuil de sensibilité et le degré de spécificité sont à priori justiciables d'améliorations considérables sans que pour autant ne soit maintenue une valeur pratique tout à fait satisfaisante. Cette méthode permet en outre d'envisager la détermination du cholestérol dans divers liquides biologiques à faible taux.

Avant d'aborder la partie expérimentale de notre travail, il nous paraît nécessaire de faire un rappel des différentes méthodes de dosage du cholestérol. Ce rappel constitue la première partie de ce travail.

Dans la seconde partie nous envisagerons l'étude expérimentale de deux facteurs susceptibles d'influencer le développement de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD (solvants et acides arylsulfoniques).

Une troisième partie est consacrée à l'évaluation comparée de diverses méthodes permettant d'éliminer l'interférence de la bilirubine dans la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD utilisée en voie directe.

L'étude analytique théorique de la fluorescence développée par les réactions de LIEBERMANN-BURCHARD et de ZAK constitue la quatrième partie de ce travail.

Enfin dans une cinquième partie diverses applications de la spectrofluorescence sont décrites et les limites de sépcificité sont précisées.

--oOo--

PREMIÈRE PARTIE

CLASSIFICATION DES MÉTHODES DE DOSAGE DU CHOLESTÉROL

On peut classer les méthodes de dosage du cholestérol sérique en trois grand groupes :

A) Les méthodes classiques faisant appel à la colorimétrie sans intervention d'enzymes,

B) Les méthodes modernes enzymatiques,

C) Les méthodes peu utilisées :

- soit parce qu'elles sont actuellement dépassées (méthodes gravimétriques par exemple),
- soit parce que l'appareillage impliqué n'entre pas dans l'équipement habituel d'un laboratoire courant de biologie clinique (spectrophotométrie infra-rouge par exemple).

A. METHODES UTILISANT LA SPECTROPHOTOCOLORIMETRIE CLASSIQUE.

Elles se différencient par :

1.- La nature de la réaction colorée utilisée,

2.- La plus ou moins grande complexité des étapes analytiques impliquées.

1. LA NATURE DE LA REACTION COLOREE.

Elles reposent toutes sur le même principe : l'oxydation du cholestérol en milieu acide et anhydre. La nature de l'agent oxydant utilisé détermine l'aspect de la coloration obtenue.

Les réactions colorimétriques les plus classiques sont :

1.- La réaction de LIEBERMANN - BURCHARD décrite en 1885 (96-22).

2.- La réaction de SALKOWSKI décrite en 1872 (138).

3.- La réaction de TSCHUGAEFF décrite en 1900 (159).

a) LA REACTION DE LIEBERMANN - BURCHARD (96 - 22).

C'est la réaction colorée la plus connue et la plus employée.

1. Principe :

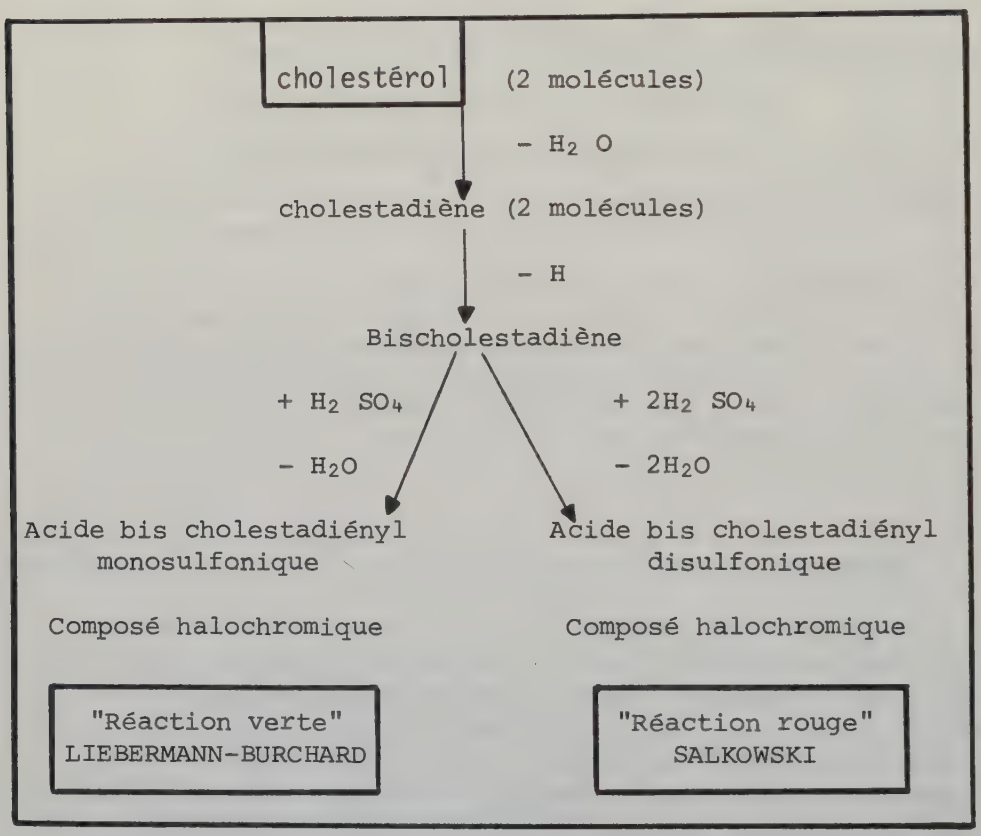
Le cholestérol, en solution chloroformique, donne en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique une coloration mauve qui vire très rapidement au bleu puis au vert. Le maximum d'absorption se situe à une longueur d'onde de 660 nm.

2. Mécanisme :

- D'après les travaux de LANGE (91) et DULOU (41) et BRIESKORN et CAPPUANO (20) le mécanisme probable de la réaction de LIEBERMANN comporte deux étapes : une déshydratation du cholestérol avec formation d'un cholestadiène à doubles liaisons conjuguées suivie d'une dimérisation en bischolestadiène, une sulfonation conduisant à un acide monosulfonique et obtention finale d'un composé halochromique vert, l'acide bischolestadiényl monosulfonique (figure n°1) - WATANABE (165) confirme cette hypothèse en isolant le bis cholestadiène par chromatographie sur colonne d'une solution obtenue en développant la réaction de LIEBERMANN - BURCHARD sur une solution concentrée de cholestérol.

- BRIESKORN et HOFMANN (21) pensent que la formation du dimère n'est pas la principale réaction ; selon ces auteurs le mécanisme le plus probable est l'oxydation du cholestérol conduisant à la formation d'un pentadiène.

Figure n° 1



Mécanisme des réactions de LIEBERMANN-BURCHARD et de SALKOWSKI d'après BRIESKORN et CAPPUANO (20).

- Les travaux plus récents de BURKE - DIAMONDSTONE (23) et VELAPOLDI (163), basés sur des faits expérimentaux précis, permettent d'expliquer le mécanisme le plus vraisemblable de cette réaction.
Il comprend deux étapes successives :

- La première étape, commune avec la réaction de ZAK, conduit à la formation d'un ion carbonium du 3 - 5 cholestadiène par protonation de l'hydroxyle du cholestérol entrainant sa déshydratation en milieu sulfo-acétique.
- La seconde étape comporte une série d'oxydations sous l'action conjuguée de l'acide sulfurique (agent d'oxydation) et de l'anhydride acétique (agent de fixation de l'eau produite). Elle aboutit à la formation d'un cation pentaénylique qui correspond au produit bleu vert dont le maximum d'absorption se situe à une longueur d'onde d'environ 620 nm. L'oxydation se poursuit un certain temps pour donner de l'acide cholestahexaénique sulfonique dont le maximum d'absorption se situe à une longueur d'onde de 410 nm. Aucune étape intermédiaire n'a été isolée. Le mécanisme réactionnel est schématisé dans la figure n°2.

3. Etude qualitative des éléments de la réaction :

1. Composition du mélange réactionnel :

Le mélange réactionnel proposé à l'origine par LIEBERMANN et composé d'anhydride acétique et d'acide sulfurique en milieu chloroformique se conserve très mal. Il est actuellement remplacé par un mélange ternaire classique constitué d'anhydride acétique, d'acide acétique et d'acide sulfurique (PEARSON - FERRO).

2. Eléments spectraux :

L'allure spectrale est caractérisée par deux maximum d'absorption respectivement situés à :

- 620 nm : correspondant à la coloration bleue,
- 410 nm : correspondant à la coloration jaune.

Classiquement, la lecture s'effectue à 620 nm.

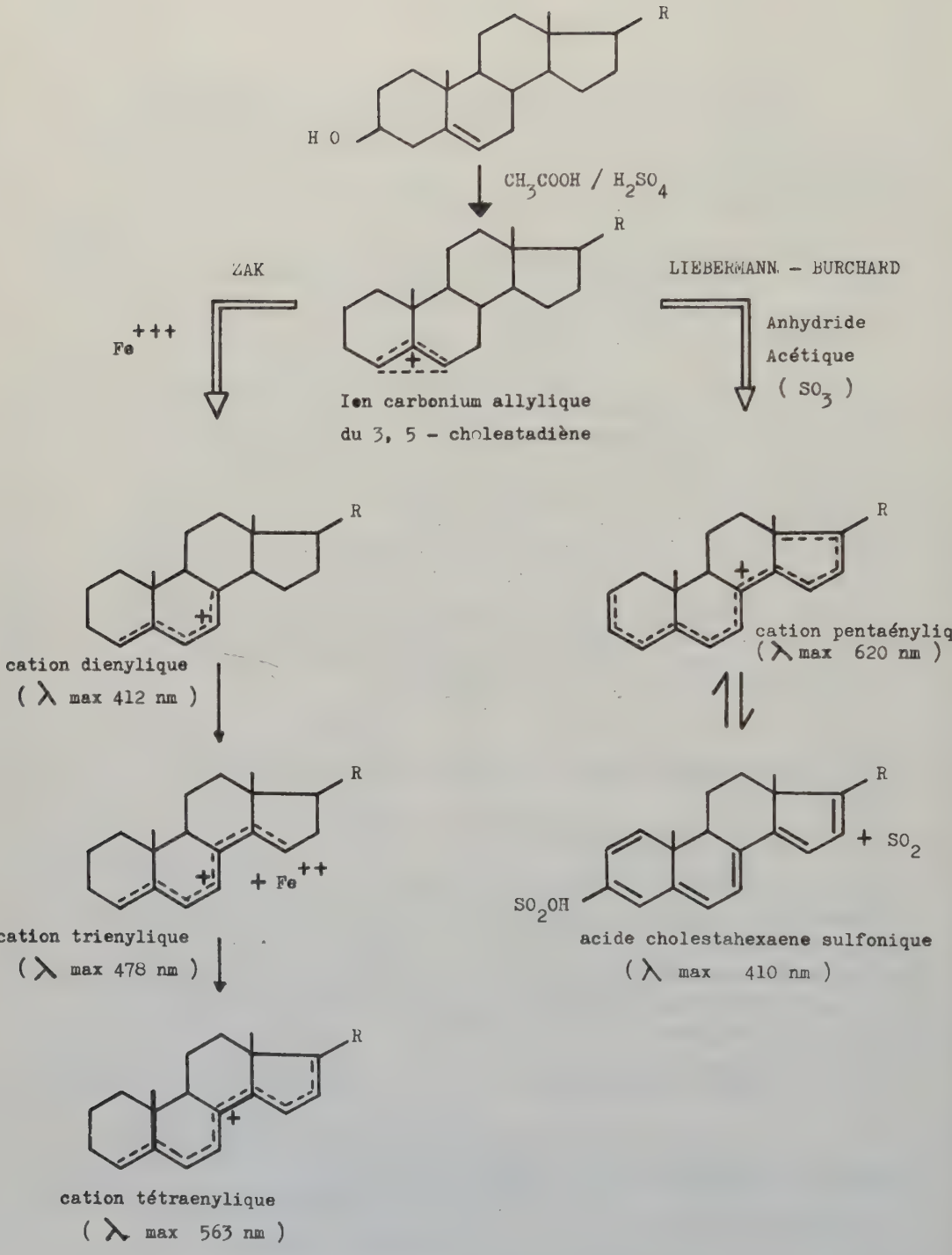


FIGURE N° 2 : Mécanisme supposé des réactions de Liebermann-Burchard et Zak d'aprés Burke et coll. (23).

Cette réaction de base a subi deux modifications:

1.- L'acide acétique, miscible à l'acide sulfurique, a remplacé le chloroforme (97),

2.- L'adjonction d'un catalyseur, exerçant un effet bathochrome et hyperchrome, conduit à une coloration différente beaucoup plus sensible : le protocole de ZAK qui utilise les ions ferriques, est le plus connu (175,179).

2. Mécanisme.

Des étapes identiques à celles décrites pour la réaction de LIEBERMANN - BURCHARD permettent d'expliquer le mécanisme de la réaction :

1.- La formation d'un acide bischolestadiényle disulfonique (figure n°1 BRIESKORN et CAPPUANO (20)).

2.- Selon BURKE et collaborateurs ((23) figure n°2).

- formation d'un ion carbonium du 3 - 5 cholestadiène,
- oxydation sous l'action des ions Fe^{+++} en cation tétraénylique coloré en violet dont le maximum d'absorption se situe à 563 nm.

Des conditions expérimentales particulières (composition du mélange réactionnel, concentration en ions Fe^{+++}, température) permettent de mettre en évidence les étapes intermédiaires et successives de cette réaction. La figure 3 reproduit l'allure et l'évolution spectrale en fonction du temps de la réaction de ZAK. Le spectre d'absorption montre trois pics successifs :

1.- un pic à 412 nm correspondant au cation diénylique,

2.- un pic à 478 nm correspondant au cation triénylique,

3.- un pic à 563 nm correspondant au cation tétraénylique.

Le pic à 412 nm diminue pour donner le pic à 478 nm qui se transforme progressivementen un pic situé à 563 nm, longueur d'onde à laquelle la réaction colorée est classiquement mesurée. La coloration obtenue est sept fois plus sensible que celle de LIEBERMANN - BURCHARD. BURKE attribue ce fait à l'effet stabilisant qu'exerce la concentration en acide sulfurique du réactif de ZAK sur la formation des cations cholestapolyéniques.

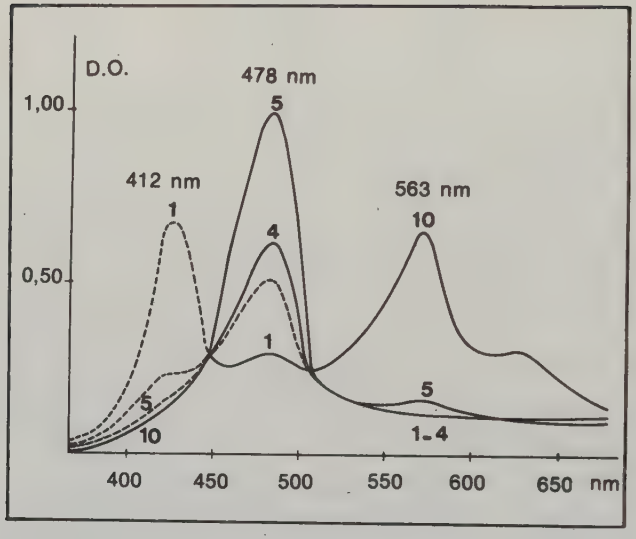


FIGURE N° 3 :

Evolutiom du spectre de la coloration de ZAK en fonction du temps d'aprés Burke et coll. (23).

Il est cependant possible d'utiliser la coloration jaune en effectuant la lecture à 410 nm (84 - 104).

3. La température :

Elle influence considérablement la cinétique de la réaction et donc la stabilité de la coloration (34 - 104).

- A 620 nm, la vitesse de développement de la réaction augmente très rapidement avec la température. Alors qu'à 20°C, la réaction présente une stabilité d'au moins 30 minutes, à 30°C la réaction n'est pas stable plus de 5 minutes et encore moins à une température supérieure.
- A 410 nm, la réaction est indiscutablement beaucoup plus lente : il faut une température de 50°C pendant une heure pour que le maximum d'absorption soit atteint. Ceci explique l'évolution de la coloration dans le temps qui passe progressivement du bleu au vert puis au jaune. Le bleu correspond à la prépondérance du pic à 620 nm, le vert à la superposition des deux pics (620 et 410 nm), le jaune à la prépondérance du pic à 410 nm.

4. La lumière :

Certains auteurs (72 - 104) ont signalé la photosensibilité de la réaction de LIEBERMANN - BURCHARD. Selon CROCKETT (34), celle-ci n'est pas aussi évidente.

b) LA REACTION DE SALKOWSKI (138).

1. Principe.

Le cholestérol, en solution chloroformique, donne en milieu sulfurique concentré une intense coloration rouge dans la phase chloroformique et une fluorescence verte dans la phase sulfurique (90). Le maxiumum d'absorption de la coloration rouge se situe à 490 nm.

3. Etude des éléments de la réaction :

La nature du catalyseur utilisé permet de distinguer deux types principaux de réactions dérivées de la réaction de SALKOWSKI qui connaissent, sur le plan pratique, un développement très inégal :

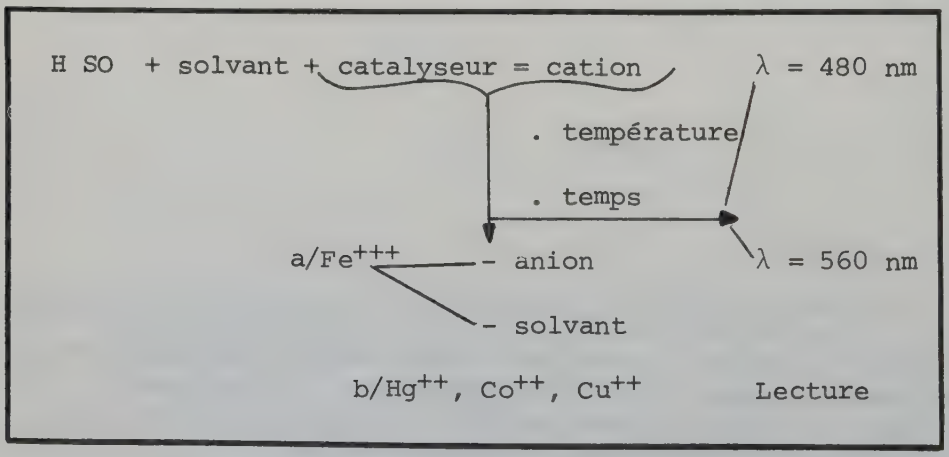
a) la réaction de ZAK, utilisant les ions Fe^{+++}, est à la base de nombreuses techniques couramment employées,

b) les réactions utilisant d'autres catalyseurs sont surtout intéressantes sur le plan théorique.

a) La réaction de Zak

Les différents éléments de la réaction de ZAK ont fait l'objet de nombreuses études et ont donné naissance à un grand nombre de protocoles techniques. La figure 4 résume l'ensemble des paramètres étudiés.

Figure 4 - Les différents éléments de la réaction de ZAK.



1. La composition du mélange réactionnel.

Elle dépend du rapport acide sulfurique/solvant déterminant le pourcentage en acide sulfurique.

- 40 % dans le mélange classique :

  H_2SO_4 2 volumes/solvant 3 volumes (18, 29, 32, 65, 77, 117, 173, 179).

- 45 % H_2SO_4 2,5 volumes/solvant 3 volumes (8, 49).

- 50 % H_2SO_4 2 volumes/solvant 2 volumes (19, 92, 146).

- 25 % H_2SO_4 2 volumes/solvant 6 volumes (143).

La concentration en acide sulfurique conditionne l'allure spectrale de la réaction de ZAK : plus elle est importante, plus elle favorise la formation du pic à 478nm et ralentit par conséquent la formation du pic à 560 nm (23).

2. Le solvant de réaction.

Trois solvants ont été proposés :

1.- L'acide acétique (6, 146, 176, 179) est le plus utilisé. L'emploi d'un acide acétique très pur exempt d'aldéhyde est impératif ; en effet le tryptophane des protéines sériques développe une coloration violette parasite en présence d'aldéhyde glyoxylique contenu dans l'acide acétique ordinaire (réaction d'ADAMKIEWIEZ - HOPKINS (66)). Cette interférence entrainerait des erreurs par excès de 0,80 à 1 g/litre (179).

2.- L'acétate d'éthyle (7, 49, 65, 88, 173) améliore la fluidité du mélange réactionnel et donne une coloration plus stable (49).

3.- L'éthanol donne une coloration moins intense et moins stable que l'acide acétique (49).

3. *Le cation ferrique.*

On peut faire à son sujet diverses remarques :

a) Sur le plan qualitatif :

- *La nature du sel ferrique c'est-à-dire de l'anion* accompagnant Fe^{+++} est assez variable :
  - . le perchlorure de fer est le plus couramment utilisé (8 - 19 - 27 - 49 - 175 - 176 - 179).
  - . le chlorure de fer et d'ammonium améliorerait la stabilité du réactif au cours du temps (176).
  - . les bromure et acétate ferriques donnent les mêmes résultats que le perchlorure (49).
  - . selon WYBENGA (173), le perchlorate ferrique procure une stabilité plus grande que le perchlorure.
  - . enfin, on a utilisé le sulfate ferrique (77 - 78 - 117) ainsi que le sulfate de fer et d'ammonium (43).
- *le solvant de préparation du catalyseur* est également différent suivant les auteurs. On a utilisé l'acide acétique (18 - 175), l'acétate d'éthyle (7 - 8 - 49 - 135) et l'acide phosphorique (92).

b) Sur le plan quantitatif :

La plupart des auteurs utilisent dans le mélange réactionnel final une concentration en ions Fe^{+++} $\frac{M}{540}$

Cette concentration en Fe^{+++} est importante puisqu'on sait à l'heure actuelle que Fe^{+++} est l'agent oxydant prépondérant (23).

Une étude intéressante sur l'influence de la concentration en Fe^{+++} dans le mélange réactionnel final a d'ailleurs été rapportée par CRAWFORD (32), ROSENTHAL (135) et FRANEY et AMADOR (49).

4. La température.

Elle oriente et accélère la formation du cation tétraénylique (λ max = 563 nm) (163).

La réaction de ZAK classique se développe à une température, plus ou moins contrôlée en fonction du mode opératoire, comprise entre 60°C et 70°C (143). La reproductibilité des résultats dépend étroitement de cette température. En effet, les travaux de GIRARD et ASSOUS (6) ont montré l'influence prépondérante de la température qui, vers 65°C, conduit à une cinétique identique pour le cholestérol et ses esters, alors que, pour des températures inférieures, les cinétiques sont tout à fait différentes. Un protocole opératoire proposé par ces auteurs permet d'ailleurs de doser le cholestérol libre et le cholestérol total en opérant à deux températures différentes, et de déterminer ainsi le rapport $\frac{\text{cholestérol estérifié}}{\text{cholestérol total}}$.

D'autres températures ont été proposées : 95 - 100°C (14 - 65 - 173).

5. Le temps de développement de la réaction colorée.

Il est fonction de la température :

- 30 à 40 minutes pour une température de 60°C,
- quelques minutes à 100°C.

6. Le choix de la longueur d'onde de lecture.

Bien que certains auteurs (88 - 143) aient proposé d'effectuer la lecture à 480 nm, celle-ci se fait généralement à 560 nm.

b) Les techniques utilisant d'autres catalyseurs

D'autres catalyseurs pourraient être utilisés mais ils n'ont pas trouvé une application pratique en biochimie clinique. On peut citer :

- le cobalt Co^{++}, sous forme de chlorure de cobalt (154),
- le cuivre Cu^{++}, sous forme de chlorure cuivrique (176), il développe une coloration dont le maximum d'absorption se situe à 550 nm.
- le mercure Hg^{++}, sous forme :
  . d'acétate mercurique (λ max = 475 nm) (176),
  . d'oxyde jaune de mercure (60).

  Le mélange réactionnel acétosulfurique/Hg^{++} très riche en acide sulfurique, donne, en présence de cholestérol, un composé coloré en rose rouge (λ max = 500 nm). Cette réaction, pourtant cinq fois plus sensible que celle de LIEBERMANN - BURCHARD, n'a pas fait l'objet d'application pratique .

c) LA REACTION DE TSCHUGAEFF (159).

- Principe.

Le cholestérol, en présence d'une solution acétique de chlorure d'acétyle et de chlorure de zinc, donne une coloration rose dont le maximum d'absorption se situe à 528 nm.

Cette réaction, quinze fois plus sensible que la réaction de LIEBERMANN (134), a été relativement peu étudiée (58, 156, 174). Elle est en effet difficilement utilisable en pratique courante : le chlorure d'acétyle dégage, en présence de traces d'eau, des vapeurs d'acide chlorhydrique extrêmement nocives tant pour l'expérimentateur que pour l'appareillage.

A côté de ces trois types de méthodes colorimétriques, il faut en citer deux autres qui mettent en jeu des aldéhydes :

1. L'anisaldéhyde (83).

Le cholestérol donne avec le chlorure d'aluminium anhydre et l'anisaldéhyde une coloration rouge (λ max = 536nm). Cette réaction n'a pas reçu d'application importante en biochimie.

2. L'orthophtaldéhyde.

Le cholestérol donne avec cet aldéhyde aromatique en milieu acétosulfurique une coloration rouge (λ max = 550nm).

Décrite par ZAK (178), cette réaction, surtout étudiée au Japon (110, 136), est très stable et trois fois plus sensible que la réaction de ZAK utilisant les ions ferriques.

2. COMPLEXITE DES ETAPES ANALYTIQUES IMPLIQUEES.

Les techniques de dosage du cholestérol se différencient par la nature et le nombre des étapes précédant le développement de la réaction colorée.

On peut ainsi distinguer :

- *LES METHODES CLASSIQUES*

qui comportent les opérations suivantes :

1.- rupture des cénapses lipido-protidiques,

2.- extraction de la totalité du cholestérol (cholestérol alcoolique dit libre et esters du cholestérol),

3.- saponification de la fraction estérifiée,

4.- précipitation sous forme de complexe avec le digitonoside ou la tomatine.

Le dosage colorimétrique est ensuite réalisé sur le "cholestérol libre" obtenu directement ou après dissociation du complexe précédent.

- *LES METHODES MODERNES.*

Elles reposent sur les réactions colorées décrites plus haut obtenues par addition directe d'une microquantité de sérum à des réactifs acides.

a) LES PROTOCOLES METTANT EN ŒUVRE LA REACTION DE LIEBERMANN - BURCHARD.

Trois types de protocoles ont été proposés :

1. Les protocoles extractifs.

Ils correspondent aux méthodes comportant au moins trois temps :

a) extraction-décénapsation,

b) évaporation,

c) développement de la réaction colorée.

Ils se différencient par :

1. La nature des solvants :

On utilise en général un mélange de deux solvants. L'un polaire, un alcool, précipite les protéines, et l'autre, apolaire, extrait les lipides :

- alcool sodé - éther (53),
- alcool-éther (15, 72, 84),
- alcool - acétone (13, 141),
- méthanol - chloroforme (150),
- méthanol - méthylal (37).

On élimine ensuite le précipité de protéines par centrifugation, filtration ou décantation.

.2. *la complexité des étapes du dosage proprement dit.*

En effet, le dosage du cholestérol peut être réalisé :

- sans saponification (44),
- après saponification (1, 5) permettant de doser la totalité du cholestérol sous forme libre,
- après saponification et précipitation par le digitonoside (141, 150) ou la tomatine (79).

2. *Les protocoles semi-extractifs.*

Ils correspondent aux méthodes dites "en deux temps", car ils négligent le temps d'isolement de la phase d'extraction. Ils comportent :

1.- une extraction - décénapsation,

2.- le développement de la réaction colorée sur la solution obtenue après centrifugation ou filtration *sans évaporation.*

Après avoir pendant longtemps utilisé pour dénaturer les lipoprotéines :

- un détergent (le teepol) (67),
- un réactif précipitant :
  - . un sel neutre (93, 164),
  - . un réactif acide (148),

- on préfère à l'heure actuelle adopter une technique plus élégante, la technique de FORBES (48) : le sérum est fixé sur une zéolithe : le doucil, puis le cholestérol est extrait par du chloroforme.

3. *Les protocoles directs.*

Cinq techniques sont utilisées :

1. la méthode de PEARSON 1953 (118),
2. la méthode de RAPPAPORT 1960 (123),
3. la méthode de WATSON 1960 (166),
4. la méthode de FERRO et HAM 1960 (44),
5. la méthode de HUANG 1961 (68).

Toutes ces techniques utilisent un mélange réactionnel final constitué par de l'anhydride acétique, de l'acide acétique et de l'acide sulfurique.

- La méthode de HUANG est très proche de celle de FERRO et HAM ; elle s'en distingue uniquement par la présence dans le mélange réactionnel de sulfate de sodium anhydre.
- Mais les trois premières se différencient de celle de FERRO et HAM par les points suivants :

1. *Sur le plan qualitatif d'une part,*

a) par la présence d'un acide benzène-sulfonique:

- méthode de PEARSON : acide paratoluène-sulfonique,
- méthode de RAPPAPORT : acide sulfosalicylique,
- méthode de WATSON : acide 2 - 5 diméthylbenzène-sulfonique,
- méthode de FERRO et HAM
- mathode de HUANG

} absence d'acide benzène-sulfonique.

b) Par le protocole technique :

- Les réactions de PEARSON - RAPPAPORT et WATSON s'effectuent en deux temps comportant au total trois opérations:

. 1er temps : mélange du sérum avec l'acide acétique, l'acide benzène-sulfonique, puis addition de l'anhydride acétique.

. 2ème temps : addition d'acide sulfurique.

- La réaction de FERRO et HAM s'effectue en un seul temps comportant une seule opération : l'addition d'une micro-quantité de sérum au mélange réactionnel entièrement constitué.

2. Sur le plan quantitatif d'autre part,

par les proportions du sérum et des constituants ci-dessus dans le mélange réactionnel final (tableau n°10)

b) LES PROTOCOLES METTANT EN ŒUVRE LA REACTION DE ZAK.

Ils sont semblables à ceux de la réaction de LIEBERMANN - BURCHARD : les méthodes extractives sont peu nombreuses ; on leur préfère généralement les méthodes semi-extractives et directes.

1. Le protocole extractif est réalisé :

. sans saponification :

Divers solvants sont utilisés :

- l'isopropanol (92),
- le mélange éthanol - éther (8, 32),
- le mélange éthanol - chloroforme (176).

La séparation des protéines contenues dans le liquide d'extraction est obtenue par filtration ou centrifugation.

. avec saponification (56, 103).

2. *Le protocole semi-extractif.*

Les protéines sont précipitées par :

. l'éthanol (19, 49, 143),

. l'isopropanol (14),

. l'acide acétique (146).

3. *Le protocole semi-direct.*

Il est réalisé directement sur le sérum. Mais la précipitation des protéines par l'acide acétique (29, 175) nécessite au préalable une centrifugation avant la lecture spectrophotométrique.

4. *Le protocole direct (6, 36, 173, 179).*

Il comporte un seul temps : l'adjonction du sérum au réactif acide.

c) LES PROTOCOLES METTANT EN ŒUVRE LA REACTION DE TSCHUGAEFF.

On retrouve seulement deux types de protocoles :

- les protocoles extractifs,
- les protocoles semi-directs.

Un protocole direct n'est pas possible car, en l'absence d'acide sulfurique dans le mélange réactionnel, les protéines sériques précipitent et doivent être éliminées.

- Le protocole extractif :

- *avec saponification :* deux solvants sont utilisés :

. l'éther de pétrole (156),

. le mélange éthanol-acétone-chloroforme (58).

- *sans saponification* : dans ce cas le solvant est un mélange d'alcool, d'acétone et de trichloréthylène (174).

- *Le protocole semi-direct (174).*

Ce protocole est néanmoins dangereux pour le manipulateur.

B. METHODES ENZYMATIQUES.

Si la colorimétrie a été et reste encore très utilisée pour le dosage du cholestérol sérique en biochimie clinique, il ne faut pas méconnaître ses inconvénients, un certain manque de spécificité en particulier.
En effet, d'autres stérols présents dans le sérum (cholestanol, 7 déhydrocholestérol, 7 cholestène 3 β ol) et surtout des pigments comme la bilirubine et l'hémoglobine réagissent plus ou moins intensément avec les différents mélanges réactionnels. Si l'interférence des stérols est négligeable, il n'en est pas de même de celle de la bilirubine dans les techniques directes. Le protocole extractif ou semi-extractif devient alors indispensable, introduisant au moins une étape supplémentaire dans la réalisation du dosage. Par là-même il en résulte une diminution de la valeur pratique de ces méthodes colorimétriques.

Les méthodes de dosage par voie enzymatique ont ouvert des voies extrêmement intéressantes pour résoudre ces problèmes de spécificité.

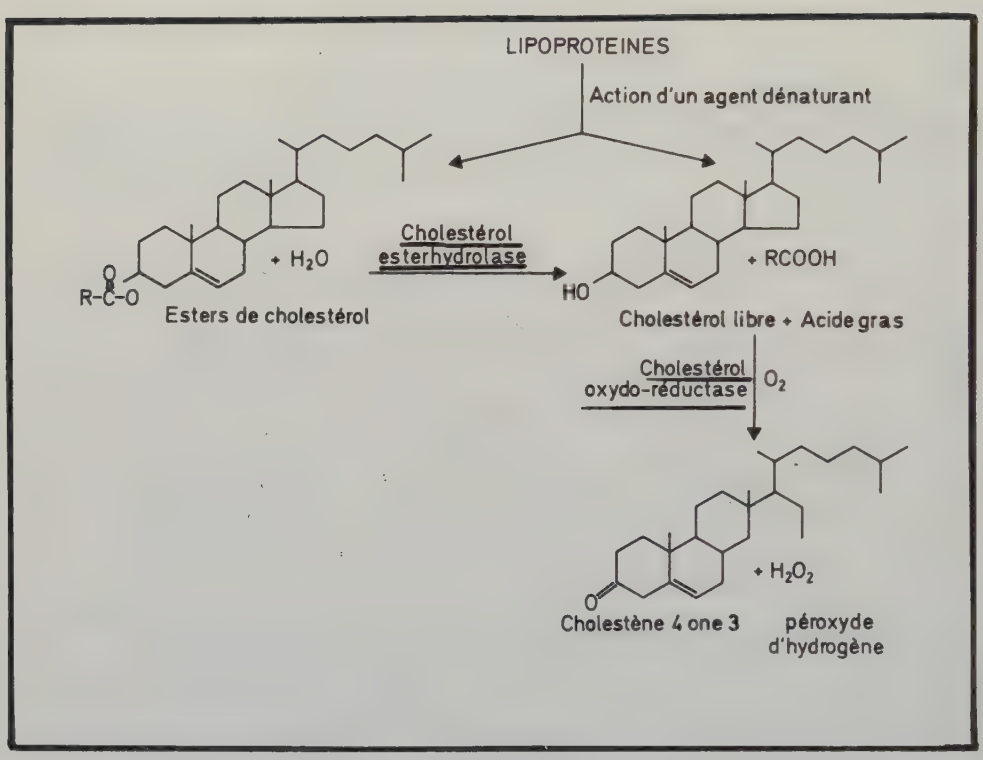


FIGURE N° 5 :

Principaux stades du dosage enzymatique du cholestérol.

1. PRINCIPE GENERAL.

On peut distinguer fondamentalement deux étapes (figure 5) :

- La première est commune aux différentes techniques. Après dénaturation des lipoprotéines et transformation de la totalité du cholestérol sérique sous forme alcoolique dite *"libre"*, celui-ci est oxydé spécifiquement sous l'action de l'oxygène moléculaire en Δ_5 cholesténone avec formation stoechiométrique de péroxyde d'hydrogène. Cette réaction est catalysée par le cholestérol oxydase.
- La deuxième étape différencie habituellement les techniques. Il s'agit du choix du processus de quantification de la transformation réalisée lors de la première étape. Nous envisagerons donc successivement les diverses caractéristiques de ces deux étapes.

2. LES CARACTERISTIQUES DE L'ETAPE COMMUNE AUX DIFFERENTES TECHNIQUES.

Trois transformations interviennent successivement.

- *La dénaturation des lipoproteines.*

Le cholestérol sérique, véhiculé par les lipoprotéines, n'est pas directement attaquable par la cholestérol oxydase. Il est donc nécessaire d'introduire un agent dénaturant les lipoprotéines pour permettre l'action de cette enzyme. Diverses substances ont été proposées :

- sels biliaires (95) : cholate de sodium ou taurocholate de sodium,
- carbowax 6000 (3),
- triton X_{100} (127, 180),
- hydroxypolyéthoxydodécane (pistocaïne)*(133).

* *Pistocaïne commercialisée par Chemische Fabrick von Heyden Gmb H 8.000 München 19.*

- *L'hydrolyse des esters du cholestérol.*

Cette hydrolyse aboutit à la transformation de la totalité du cholestérol estérifié en cholestérol alcoolique ("libre") et s'effectue sous l'action de la cholestérol estérase (EC 3.1.1.13) dont les principales caractéristiques sont rappelées ci-dessous :

- *origine :* cette enzyme est d'origine pancréatique (61, 75, 105, 106, 109).
- *spectre d'activité :* dans des conditions expérimentales déterminées, elle provoque l'hydrolyse complète de tous les esters du cholestérol à l'exception des esters arachidoniques et arachidiques.
- *caractères :*
  - . son pH optimum d'activité se situe dans une zone comprise entre 6,5 et 8,5 (133).
  - . elle est activée par les sels biliaires (17, 61, 105, 160) et inhibée par le merthiolate (160), le tween (61) et le paramercuribenzoate (71, 133).

Dans les méthodes de dosage enzymatique les plus anciennes, l'hydrolyse des esters était réalisée par saponification (46, 128).

- *L'oxydation du "cholestérol libre".*

Elle aboutit à la formation de Δ_5 cholesténone et de péroxyde d'hydrogène ; elle s'effectue sous l'action de la cholestérol oxydase (E.C. 1.1.3.6.) dont nous rappelons également les principales caractéristiques :

- *Origine :* Cette enzyme a été isolée de différents microorganismes (114) :

  Nocardia erythropolis, Brevibactérium sterolicum, Schizophyllum comune I F O 4928, *Streptomyces.*
  La plupart des techniques utilisent l'enzyme extraite du *Nocardia erythropolis* isolée par RICHMOND (128).
- *Spectre d'activité :* son action n'est pas spécifique du cholestérol. Elle s'exerce aussi sur d'autres 3 βOH stérols (cholestanol, 7 déhydrocholestérol et Δ_7 cholestène 3 βol).

Mais ces stérols étant normalement présents dans le sérum à des taux très faibles, le manque très relatif de spécificité de la cholestérol oxydase n'entraine pas d'erreurs importantes dans la détermination du cholestérol sérique (119, 120).

- *Caractères :* elle est thermostable. Son maximum d'activité se situe à des pH et des forces ioniques variables suivant son origine (114). Les différentes valeurs sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	pH	*Molarité*
Nocardia	7	0,6 M
Brevibacterium	7	0,6 M
Streptomyces	7,50	0,6 M
Schizophyllum	5	0,9 M

3. LES DIFFERENTS MODES DE QUANTIFICATION DE LA REACTION.

De nombreux modes de quantification sont possibles. Elles sont basées sur l'évaluation de l'un des trois paramètres de la réaction d'oxydation du cholestérol catalysée par la cholestérol oxydase :

1. L'oxygène,
2. La Δ_5 cholesténone,
3. L'eau oxygénée.

- *Evaluation de l'oxygène consommé (38, 82, 113).*

Elle est réalisée par polarographie à l'aide d'électrodes spécifiques sensibles à l'oxygène selon deux modalités : méthode en point final ou méthode en cinétique. Ces méthodes présentent des avantages certains : rapidité, simplicité, élimination de l'interférence de la bilirubine, utilisation d'une microquantité de sérum, mais elles nécessitent un appareillage coûteux.

- *Evaluation de la Δ_5 cholesténone formée.*

- *Par augmentation de l'absorption à 240 nm (46).*

La spectrophotométrie ne peut être appliquée directement sur le sérum en raison de la présence des protéines qui absorbent en ultra-violet à cette longueur d'onde. Une extraction préalable de la Δ_5 cholesténone étant nécessaire, cette technique demeure d'un intérêt tout à fait théorique.

- *Par condensation avec la 2 - 4 dinitrophénylhydrazine (46, 151).*

- *Evaluation de l'eau oxygénée produite :*

C'est le procédé le plus couramment utilisé. On peut classer les méthodes de dosage de l'eau oxygénée en deux groupes :

. méthodes électrochimiques,

. méthodes chimiques.

a) Méthodes électrochimiques :

Elles sont appliquées directement ou après réaction chimique.

- *Mesure directe :* l'eau oxygénée est mesurée par polarographie à l'aide d'électrodes spécifiques sensibles à l'eau oxygénée (28, 70).

- *Mesure après réaction chimique (116) :*

- Le principe est schématisé par l'équation suivante :

$$H_2O_2 + 2\,I^- + 2\,H^+ \xrightarrow[\text{catalyseur}]{Mo\,(VI)} I_2 + 2\,H_2O$$

- Le système de détection est constitué d'une électrode sensible à la variation de concentration en iodure. Cette technique est entièrement automatisée.

b) Méthodes chimiques :

On distingue là encore une méthode directe et des méthodes indirectes.

- *Méthode directe :* elle est proposée par RICHMOND (127, 128, 129). L'eau oxygénée se condense avec le Ti^{4+} et le xylénol orange pour donner un complexe coloré en rouge (λ max = 550 nm). Comme la précédente, cette technique est applicable en autoanalyse.

- *Méthodes indirectes :* elles font intervenir un troisième relai enzymatique succédant à l'action des cholestérol estérase et oxydase. Il s'agit d'une catalase ou d'une péroxydase.

Méthodes utilisant une catalase.

On peut opérer par mesure physique ou par mesure chimique :

+ *Mesure physique :* l'eau oxygénée est dosée par calorimétrie, c'est-à-dire, par mesure de la chaleur dégagée lors de la réaction enzymatique (124).

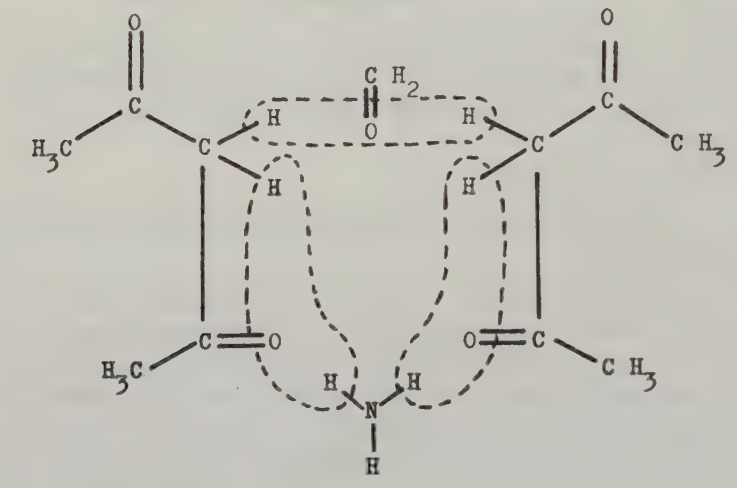
$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + 1/2\,O_2$$

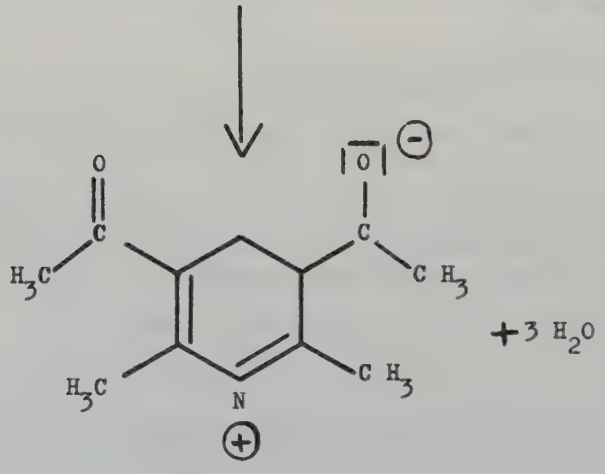
METHODE DE R O E S C H L A U

$$H_2O_2 + CH_3OH \xrightarrow{\text{catalase}} HCHO + 2\,H_2O$$

$$HCHO + 2\,CH_3 - CO - CH_2 - CO - CH_3 + NH_3 \xrightarrow{pH\ 7} \text{3-5 diacétyl 1-4 dihydrolutidine}$$

REACTION DE H A N T Z C H





3 - 5 diacétyl 1 - 4 dihydrolutidine

FIGURE N° 6 : Principe de la méthode de Roeschlau et réaction de Hantzch.

+ Mesure chimique :

1. Méthode de Roeschlau (133) :

La quantification comprend deux temps :

- L'eau oxygénée oxyde de méthanol en formaldéhyde en présence de catalase (réaction de Kageyama (80)).
- En milieu ammoniacal et à pH7, le formaldéhyde se condense avec l'acétylacétone pour donner une *3-5 diacétyl 1-4 dihydrolutidine* colorée en jaune et fluorescente (réaction de Hantzch).

On peut donc réaliser la mesure :

- par colorimétrie à la longueur d'onde de 405 nm (130, 132, 133, 162).
- par fluorimétrie (50).

Ces réactions peuvent être schématisées de la façon suivante (figure n°6) :

2. Méthode de Haeckel (55) :

Elle fait intervenir un quatrième relai enzymatique. Son principe est schématisé ci-dessous :

$$H_2O_2 + \text{éthanol} \xrightarrow[\text{catalase}]{} \text{acétaldéhyde} + 2\,H_2O$$

$$\text{acétaldéhyde} + \underline{NADP} \xrightarrow[\text{aldéhyde déshydrogénase}]{} \text{acétate} + \underline{NADPH_2}$$

On mesure l'augmentation de densité optique à 340nm.

Méthodes utilisant une péroxydase.

On peut les classer, selon le mode de détection auquel elles font appel, en méthodes colorimétriques et en méthodes fluorimétriques.

+ Méthodes colorimétriques :

- Le principe général est le suivant : en présence de péroxydase l'eau oxygénée oxyde un chromogène dont la forme oxydée est colorée.
- Selon la nature du chromogène utilisé on distingue trois méthodes de dosage :

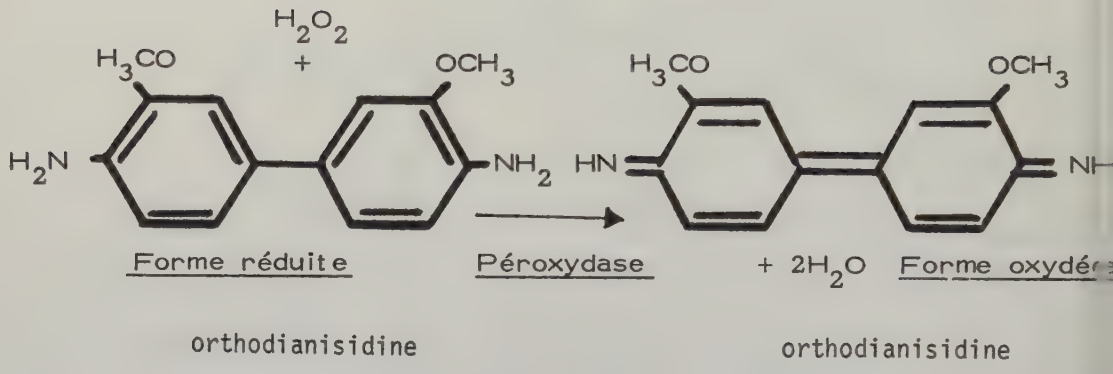


FIGURE N° 7 : Principe de la méthode de Tarbutton.

- *Méthode de Tarbutton (152) :*

L'oxygène libéré par action de la péroxydase sur l'eau oxygénée se fixe sur un accepteur d'oxygène : *l'orthodianisidine*, dont la forme réduite est incolore. La forme oxydée est colorée en jaune (λ max = 450 nm). (figure n° 7).

- *Méthode de Allain (3) :*

Elle dérive de la méthode de Trinder (157) décrite pour le dosage enzymatique du glucose à la glucose oxydase. En présence de péroxydase, la décomposition de l'eau oxygénée conduit à la condensation oxydative du couple *phénol. 4 amino-antipyrine* pour donner un chromogène à structure quinone - imine colorée en rose (λ max = 500 nm) (figure n°8).

- *Méthode de Majkic (101) :*

Le chromogène est le sel d'ammonium de *l'acide 2-2' azino di 3 éthylbenzothiazoline 6 sulfonique* (ABTS). La coloration obtenue est jaune, le maximum d'absorption se situe à 420 nm.

+ *Méthodes fluorimétriques (69) :*

En présence d'une péroxydase, l'eau oxygénée oxyde l'acide homovanillique pour former un chromogène fluorescent : *l'acide 2 - 2' dihydroxy 3.3 diméthoxydiphényl 5 - 5' diacétique.*

Quel que soit le mode de quantification choisi, les techniques enzymatiques ont en commun de nombreux avantages :

- elles sont spécifiques : éliminant le problème des interférences,
- la plupart d'entre-elles (28, 50, 95) permettent la détermination du rapport :

$$\frac{\text{cholestérol estérifié}}{\text{cholestérol total}}$$

Le cholestérol libre peut être dosé en supprimant l'action de la cholestérol oxydase,

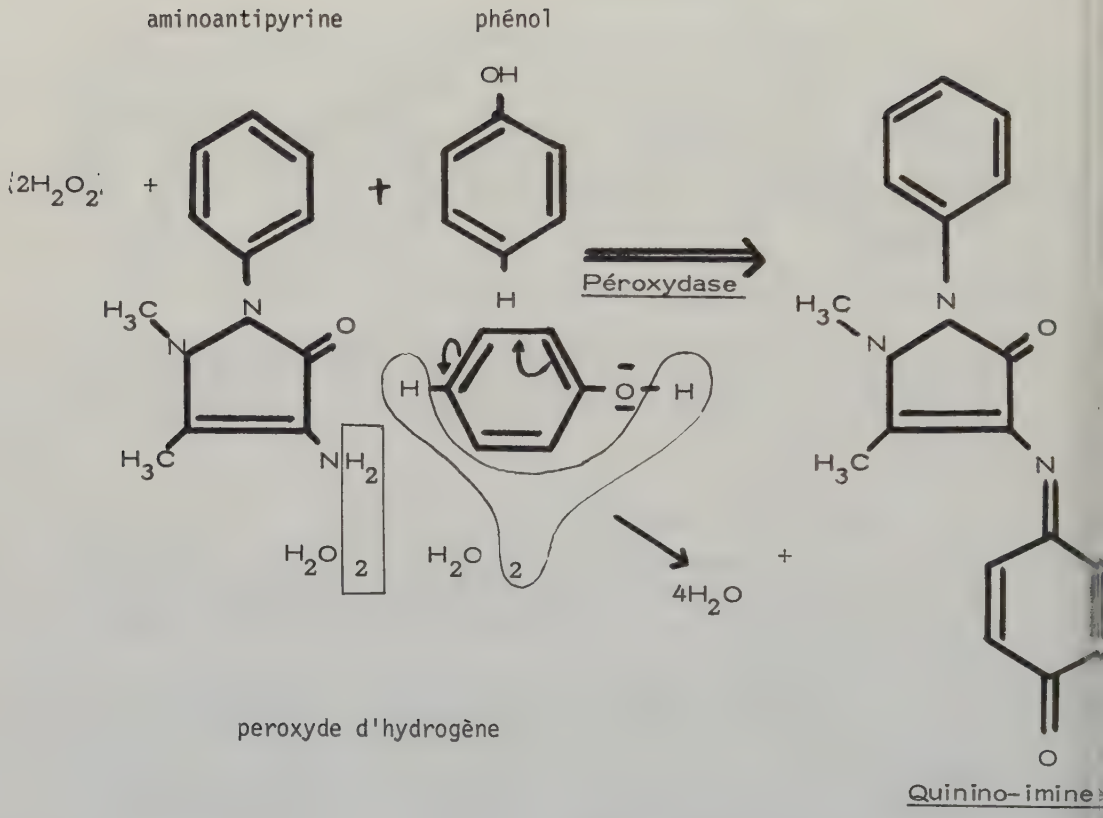


FIGURE N° 8 : Principe de la méthode de Allain.

- elles sont facilement utilisables en voie automatique :
  . autoanalyseur en flux continu (50, 95, 129, 130),
  . système par transfert Abbott ABA 100 (170),
  . système centrifuge (180).

Pour toutes ces raisons, elles tendent à remplacer actuellement les méthodes colorimétriques dans beaucoup de laboratoires.

C. METHODES DIVERSES.

Si les techniques colorimétriques et enzymatiques sont les plus connues et les plus utilisées en biologie clinique, il existe également de nombreuses autres techniques d'un intérêt tout à fait inégal.

1. Méthode gravimétrique (169).

D'intérêt historique, cette méthode est basée sur la formation du complexe insoluble *digitonoside-cholestérol* (complexe de Windaus). Cependant elle est encore souvent utilisée pour la détermination de la fraction alcoolique du cholestérol sérique et l'établissement du rapport cholestérol estérifié/cholestérol total.

2. Méthodes instrumentales.

Selon le type d'appareillage utilisé, on distingue :

- *La méthode coulométrique (158) :*

  Le cholestérol réagit avec du brome en excès. Le brome non consommé est dosé par coulométrie. Cette technique nécessite la séparation préalable du cholestérol par chromatographie en couche mince.

- *Les méthodes spectrophotométriques :*

  . *Absorption en milieu trouble :*

  + *Méthode turbidimétrique (53) :*

  Le sérum additionné d'alcool sodé donne un trouble dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en cholestérol.

+ Méthode néphélométrique (30, 121) :

La néphélométrie est réalisée sur le complexe digitonoside - cholestérol. Comme la précédente, ces techniques très anciennes n'ont aucun intérêt pratique.

. Absorption dans l'UV et l'I.R. :

Après extraction et purification, le cholestérol peut être dosé en utilisant son maximum d'absorption dans l'ultraviolet (λ max = 205 nm)(168) ou dans l'infrarouge (λ = 1620 - 1600 sm^{-1})(54). Cette technique est adoptée par FLEROV (47)pour suivre l'évolution des hépatites aiguës et des cirrhoses.

- *Spectrophotométrie de masse et dilution isotopique (12, 144).*

Cette technique d'une extraordinaire sensibilité permet des prises d'essai de 10^{-1} à 10^{-3}µl de sérum. Elle donne des résultats en parfaite corrélation avec les techniques enzymatiques et avec la chromatographie gaz - liquide. La complexité de l'appareillage ne permet cependant pas d'envisager l'application de cette méthode à la pratique courante.

- *Chromatographie en phase gazeuse :*

L'application de cette technique au dosage du cholestérol sérique est relativement récente. Les divers modes opératoires décrits comportent tous deux étapes :

1. La préparation de l'échantillon :

. Saponification et extraction du cholestérol.

- *La saponification* est réalisée par de la potasse alcoolique (26, 40, 63) ou par de l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMH en solution à 20 % dans le méthanol) (4, 100).

Ce réactif préconisé par MAC GEE (100) présente deux avantages :

. Il n'affecte pas le rendement de la colonne,

. Il évite la méthylation du cholestérol.

- *L'extraction* est réalisée par l'heptane (40, 167), par l'hexane (63), par l'éther de pétrole (26), par l'acétate d'éthyle lorsqu'on utilise le TMH (100).

  . *La silylation* nécessaire dans certains cas, est effectuée par le mélange : bistriméthyl-silylacétamide, trichloréthane, pyridine (63).

2. *L'analyse chromatographique proprement dite :*

On utilise le plus souvent des colonnes type SE 30 ou OV 17. Support gas chrom Q 100-120 mesh.

Le standard interne peut être soit le cholestane, l'acétate de cholestérol ou le cholestanol.
La spécificité et la sensibilité de cette technique la rendent applicable au dosage du cholestérol dans les liquides biologiques dont les concentrations sont trop faibles pour être évaluées par les techniques habituelles (liquide amniotique par exemple (115)).

- *La fluorescence.*

Peu d'études ont été réalisées dans ce domaine.
Les méthodes fluorométriques sont basées sur l'utilisation des trois réactions colorées classiques déjà décrites :

. réaction de LIEBERMANN-BURCHARD,

. réaction de ZAK,

. réaction de TSCHUGAEFF.

Le cholestérol, utilisé à des concentrations plus faibles, donne des produits d'oxydation fluorescents.

Ces méthodes se différencient par :

.*La nature de la réaction mise en jeu*

-réaction de LIEBERMANN-BURCHARD,
-réaction de ZAK,
-réaction de TSCHUGAEFF.

- *La réaction de LIEBERMANN-BURCHARD :*

. elle développe une fluorescence *rouge orangée*. ALBERS et LOWRY (2) l'ont appliquée en 1955 pour la premières fois à la détermination du cholestérol dans les tissus.

. l'allure spectrale est caractérisée par une excitation maxima à λ_{Ex} = 540 nm et une fluorescence maxima à λ_{Em} = 590 nm.

. des améliorations dans la réalisation pratique ont été apportées par la suite pour rendre cette réaction applicable au dosage du cholestérol dans le sérum (24, 89, 99).

- *La réaction de ZAK :*

L'utilisation de cette réaction en fluorimétrie est très récente. Elle a été étudiée par deux auteurs : SOLOW (147) en 1970 et BADZIO (9) en 1975 qui opèrent sur le plan spectral dans des conditions tout à fait différentes.

Selon SOLOW : λ_{Ex} = 540 nm,
λ_{Em} = 565 nm,

Selon BADZIO : λ_{Ex} = zone 400 - 436 nm,
λ_{Em} = 500 nm.

Cette réaction est d'une extrême sensibilité. Elle permet de doser le cholestérol non seulement dans le sérum mais également dans le liquide céphalo-rachidien (147) et dans les fractions lipoprotéiniques séparées préalablement par électrophorèse (9).

- *La réaction de TSCHUGAEFF :*

Elle a également reçu des applications en fluorescence (16, 153). La détection est réalisée dans les conditions suivantes :

λ_{Ex} = 525 nm,
λ_{Em} = 565 nm.

. *La plus ou moins grande complexité des étapes analytiques impliquées :*

Quel que soit le type de réaction choisi, on retrouve des protocoles extractifs, semi-extractifs et semi-directs.

+ *Les protocoles extractifs sont réalisés :*

- avec saponification (2, 24, 89),
- sans saponification (9, 16, 153) puisque les esters du cholestérol développent une fluorescence identique à celle du cholestérol.

+ *Le protocole semi-extractif :* l'extraction décénapsation est réalisée par l'isopropanol (147) ou par le mélange chloroforme - méthanol (131).

+ *Le protocole semi-direct :* les protéines sont précipitées par le mélange acide acétique - anhydride acétique (99). Aucun protocole direct n'a été décrit.

Comparée aux autres techniques colorimétriques, la fluorométrie a l'avantage d'être beaucoup plus sensible que celles-ci. On y retrouve pour les trois réactions utilisées, un degré de sensibilité relative parallèle à celui observé en colorimétrie. La plus ou moins grande complexité des protocoles opératoires, les impératifs inhérents au procédé analytique lui-même (pûreté des réactifs, propreté du matériel) peuvent expliquer le peu d'intérêt qu'elles ont suscité jusqu'à présent.

--oOo--

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES SOLVANTS ET DES ACIDES ARYLSULFONIQUES DANS LA RÉACTION DE LIEBERMANN-BURCHARD

Malgré le nombre et le volume des travaux consacrés aux applications de la réaction de LIEBERMANN - BURCHARD au dosage du cholestérol sérique, il nous a paru intéressant d'apporter une contribution personnelle sur ce sujet par l'étude de divers facteurs susceptibles d'influencer le développement de cette réaction colorée.

Trois points ont plus particulièrement retenu notre attention :

- le rôle éventuel du solvant de réaction,
- le rôle des acides benzène - sulfoniques utilisés dans un certain nombre de méthodes directes,
- l'interférence de la bilirubine dans les méthodes directes.

Les deux premiers points font l'objet de cette deuxième partie tandis que l'interférence de la bilirubine sera envisagée dans la troisième partie.

--oOo--

CHAPITRE I

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES SOLVANTS

L'importance du solvant dans la réaction de Liebermann-Burchard n'a pas fait l'objet d'études particulières (90). Seul le chloroforme occupe une place privilégiée dans la méthode originale de LIEBERMANN et dans les méthodes semi-extractives.

Dans les méthodes extractives, une étape préalable d'évaporation du solvant est nécessaire. En effet, ou bien le solvant (éther, éther de pétrole) n'est pas miscible avec le mélange réactionnel, ou bien le solvant (éthanol, éthanol-acétone, méthanol-méthylal) est miscible mais il entraine alors une certaine quantité d'eau provenant du sérum. Cette hydratation du mélange réactionnel est susceptible de fausser le développement de la réaction colorée pour laquelle un milieu strictement anhydre avait été préconisé dans la description originale de la réaction. Nous verrons ultérieurement que cette exigence n'est ni aussi absolue ni aussi simple qu'on avait pu le penser. En effet, d'une part une certaine hydratation du milieu réactionnel est compatible avec un développement normal de la réaction colorée, d'autre part l'hydratation ne constitue qu'un cas particulier et limite d'intervention du solvant sur cette même réaction.

I. MATERIEL ET METHODES.

- *Produits chimiques et réactifs* :

- *Produits chimiques :* tous les produits utilisés pour cette étude sont de marque Merck, à l'exclusion du cholestérol Sigma et du trichloréthane Carlo Erba.

- *Réactifs :*

- Solution chloroformique de cholestérol à 0,80 g/litre.
- Mélange réactionnel de FERRO de composition suivante :
  - . anhydride acétique.....550 ml.
  - . acide acétique.....450 ml.
  - . acide sulfurique.....200 ml.

Dans un ballon placé dans la glace, on introduit successivement l'anhydride acétique et l'acide acétique. On ajoute lentement et en agitant l'acide sulfurique de façon à éviter toute élévation de température. Ainsi préparé, ce mélange se conserve une semaine à + 4°C.

- *Appareillage :* Spectrophotomètre Philips Unicam SP 800 avec programmation.
Cet appareil, équipé d'un chariot porte cuve à déplacement automatique, permet une lecture successive sur quatre cuves. Il rend très fiable l'étude comparative des différents solvants.

- *Protocole opératoire :*

- Il est simple. *Dans une série de tubes à essais,* on évapore à la température de 37°C des fractions de 1 ml de la solution chloroformique.
- *Le résidu d'évaporation* est repris par des quantités variables de solvant jusqu'à entière solubilisation. Parallèlement on effectue un blanc avec la même quantité de solvant.
- *On ajoute lentement* et avec précaution, 4 ml de mélange réactionnel de façon à éviter le mélange avec la solution de reprise.

- *On agite alors vigoureusement* pendant 20 secondes puis on suit au spectrophotomètre, à la température de 25°C, le développement de la réaction colorée sous ces différents aspects.

II. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Les solvants ont été classés en fonction de leur nature chimique en deux groupes, d'une part les solvants minéraux, d'autre part les solvants organiques. Leur influence dans cette réaction est envisagée :

- sur le plan qualitatif : allure spectrale et cinétique,
- sur le plan quantitatif: sensibilité, le chloroforme étant pris comme référence.

SOLVANTS MINERAUX.

Nous avons pris comme exemple l'eau et les acides phosphorique et perchlorique.

L'EAU.

La réaction colorée est développée dans cinq tubes à essais contenant respectivement :

0 - 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,40 ml d'eau.

- Sur le plan spectral :

- les trois premiers tubes donnent le même maximum d'absorption situé à 615 nm, correspondant à une coloration bleue.

- les deux derniers tubes ne donnent pas de maximum d'absorption précis mais un large dôme centré sur 510 nm. La coloration est rose.
- le passage de la coloration bleue à la coloration rose s'effectue pour une affusion précise de 0,28 ml d'eau.

- *Sur le plan cinétique :*

Dans les tubes 1, 2, 3, la cinétique est d'autant plus rapide que la teneur en eau est grande. Cette constatation n'est pas pour nous surprendre: en effet le degré d'échauffement thermique qui correspond à l'hydratation du mélange réactionnel est proportionnel à la teneur en eau. Il est donc tout à fait normal que la réaction évolue avec une vitesse parallèle au degré d'échauffement.

Pour les tubes 4 et 5, où la réaction est très lente, le mécanisme réactionnel semble très différent de celui de la réaction de Liebermann.

- *Sur le plan de la sensibilité :*

L'intensité de la coloration mesurée à 615 nm est égale à 75 % de celle obtenue avec le chloroforme.

ACIDE PERCHLORIQUE ET ACIDE PHOSPHORIQUE.

- *Ces deux acides* sont ajoutés par gradients de 0,10 ml à la série de tubes à essais contenant 800 microgrammes du cholestérol. On constate qu'il n'y a pas solubilisation du cholestérol.
Par adjonction du mélange réactionnel et après agitation, la dissolution n'est pas complète. Il y a donc lieu de ne retenir que l'aspect qualitatif de cette expérimentation.

- *Avec l'acide perchlorique*, on retrouve une coloration bleue présentant le maximum d'absorption à 615 nm pour des volumes de solvants inférieurs à 0,50 ml. A partir de ce volume de solvant, la réaction est complètement inhibée.

- *Avec l'acide phosphorique*, on observe un résultat similaire mais l'inhibition de la réaction se produit seulement pour 1 ml d'acide.

SOLVANTS ORGANIQUES.

Nous avons envisagé successivement :

- des solvants chlorés et soufrés,
- des solvants hydroxylés,
- des solvants oxygénés,
- des solvants azotés,
- des hydrocarbures.

SOLVANTS CHLORES ET SOUFRES.

- *Produits étudiés.* Nous avons étudié :

. *Parmi les solvants chlorés :*

- des dérivés du *méthane :* dichlorométhane, trichlorométhane (chloroforme), tétrachlorométhane (tétrachlorure de carbone).
- des dérivés de *l'éthane :*
  . *saturés :* dichloro et trichloroéthane,
  . *insaturés :* trichloréthylène.

- *Résultats :*

. *Sur le plan qualitatif :*

Pour tous ces solvants l'allure et la cinétique réactionnelle sont identiques (figure 9).

- le maximum d'absorption se situe à 615 nm,
- la coloration atteint son maximum vers la 15ème minute, est stable de la 15ème à la 20ème minute, puis diminue très lentement, la chute de densité optique atteignant sensiblement 5 % en 60 minutes.

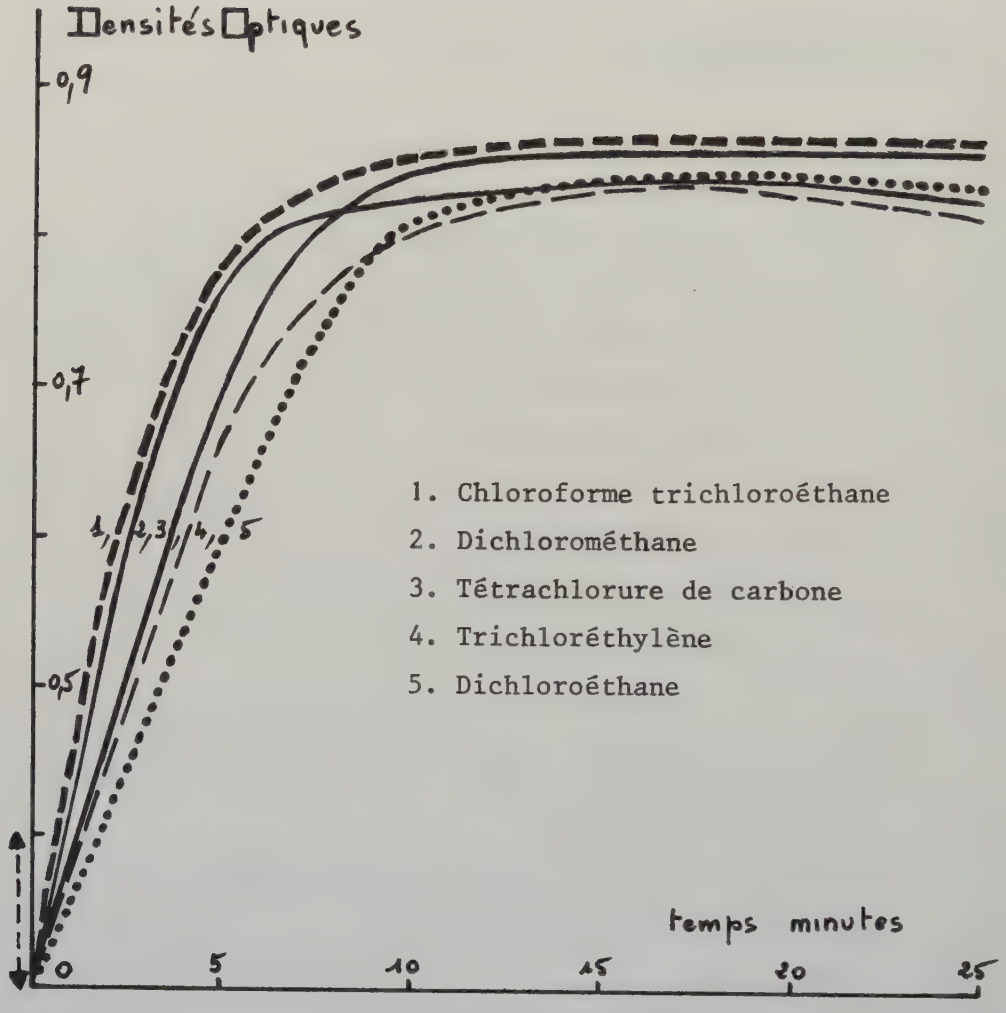


FIGURE N° 9 :

Cinétique des solvants chlorés dans le mélange de Ferro

(0,50 ml de solvant dans 4 ml de mélange réactionnel)

Par ailleurs, alors que le dichlorométhane, le chloroforme et le dichloroéthane sont miscibles en toutes proportions avec le réactif de FERRO, il existe au contraire une limite de miscibilité pour les autres solvants. Le volume limite miscible à 4 ml de mélange réactionnel est par ordre croissant de :

0,25 ml pour le sulfure de carbone,

0,70 ml pour le tétrachlorure de carbone,

1,20 ml pour le trichloréthylène,

1,70 ml pour le trichoroéthane.

- *Sur le plan quantitatif :*

Tous ces solvants conduisent à une sensibilité identique en tenant compte du facteur de dilution éventuellement introduit en raison des limites de miscibilité.

Sur le plan pratique, pour tous les solvants miscibles, il est intéressant de noter qu'il est possible de développer une réaction colorée quantifiable avec un volume de solvant égal et même supérieur à 10 ml pour 4 ml de mélange réactionnel (tableau n°1).

SOLVANTS HYDROXYLES.

1. Les alcools.

a) Produits étudiés. Nous avons retenu :

- *En série aliphatique :*

. *les alcools primaires* linéaires de 1 à 12 atomes de carbone ainsi que trois dérivés ramifiés : le méthyl 3 propanol 1 (isobutanol), le méthyl 3 pentanol 2 (isopentanol ou alcool isoamylique), le méthyl 4 pentanol 2.

. *les alcools secondaires* de C_3 à C_8 compris en position 2, de C_6 à C_8 compris en position 3.

. *les alcools tertiaires :* butanol et pentanol tertiaires.

TABLEAU N° 1 - SENSIBILITE COMPAREE DES SOLVANTS CHLORES
(exprimée en D.O.)

Volume ajouté à 4ml de M.R.	$CH_2 Cl_2$		$CH Cl_3$		$CH_3 CH Cl_2$	
	D.O.		*D.O.*		*D.O.*	
	Exp.	*Th.*	*Exp.*	*Th.*	*Exp.*	*Th.*
1 ml *référence	0,78	0,78	0,80	0,80	0,78	0,78
2 ml	0,68	0,81	0,69	0,83	0,67	0,80
3 ml	0,58	0,81	0,58	0,81	0,56	0,78
5 ml	0,48	0,77	0,48	0,86	0,46	0,74
10 ml	0,30	0,84	0,30	0,84	0,27	0,76

La D.O. théorique est calculée en tenant compte de la dilution apportée par le volume de solvant introduit. La D.O. obtenue pour un volume de solvant de 1ml dans un mélange final de 5 ml étant prise comme référence.

. *parmi les polyols :*

- les diols en C_2 : éthylène glycol (éthane diol),

  en C_3 : propane diol (propylène glycol),

  en C_4 : butanediol 1-3 et 1-4,

  en C_5 : le pentanediol 1-5,

  en C_6 : hexane diol 2-5, méthyl 2 pentane diol 2-4.

- les triols en C_3 : propane triol (glycérol) et hexane triol 1-2-6.

. *un dérivé polyfonctionnel :* l'éther monométhylique de l'éthylène glycol.

- *En série cyclique :*

- 3 alcools cyclaniques : le cyclopentanol, le cyclohexanol, le cycloheptanol.

- un alcool aromatique : l'alcool benzylique.

Pour le terbutanol, le dodécanol et le cyclohexanol qui sont solides à la température ordinaire, il est nécessaire de les liquéfier au bain marie à 37°C pendant une heure au moment de l'emploi.

L'Heptanol secondaire en position 2, l'hexane triol et le cycloheptanol donnent dans le mélange de Ferro des témoins colorés en marron très intense. Pour cette raison nous n'avons pas pu étudier le comportement de ces trois alcools.

b) Résultats.

- *Sur le plan qualitatif :*

. *allure spectrale.*

D'une manière générale, quel que soit l'alcool étudié, la coloration obtenue avec le mélange de Ferro est bleue. Son maximum d'absorption se situe à 615 nm. Seul l'éther monométhylique de l'éthylène glycol conduit à un maximum d'absorption légèrement décalé (λ max 630 nm) ; la coloration est verte.
Par ailleurs, comme dans le cas de l'eau, il existe pour ces solvants un volume limite au-delà duquel la coloration bleue ne se développe plus. On observe, suivant les cas, une faible coloration rose (λ max 510 nm) ou jaune pâle (λ max impossible à préciser).

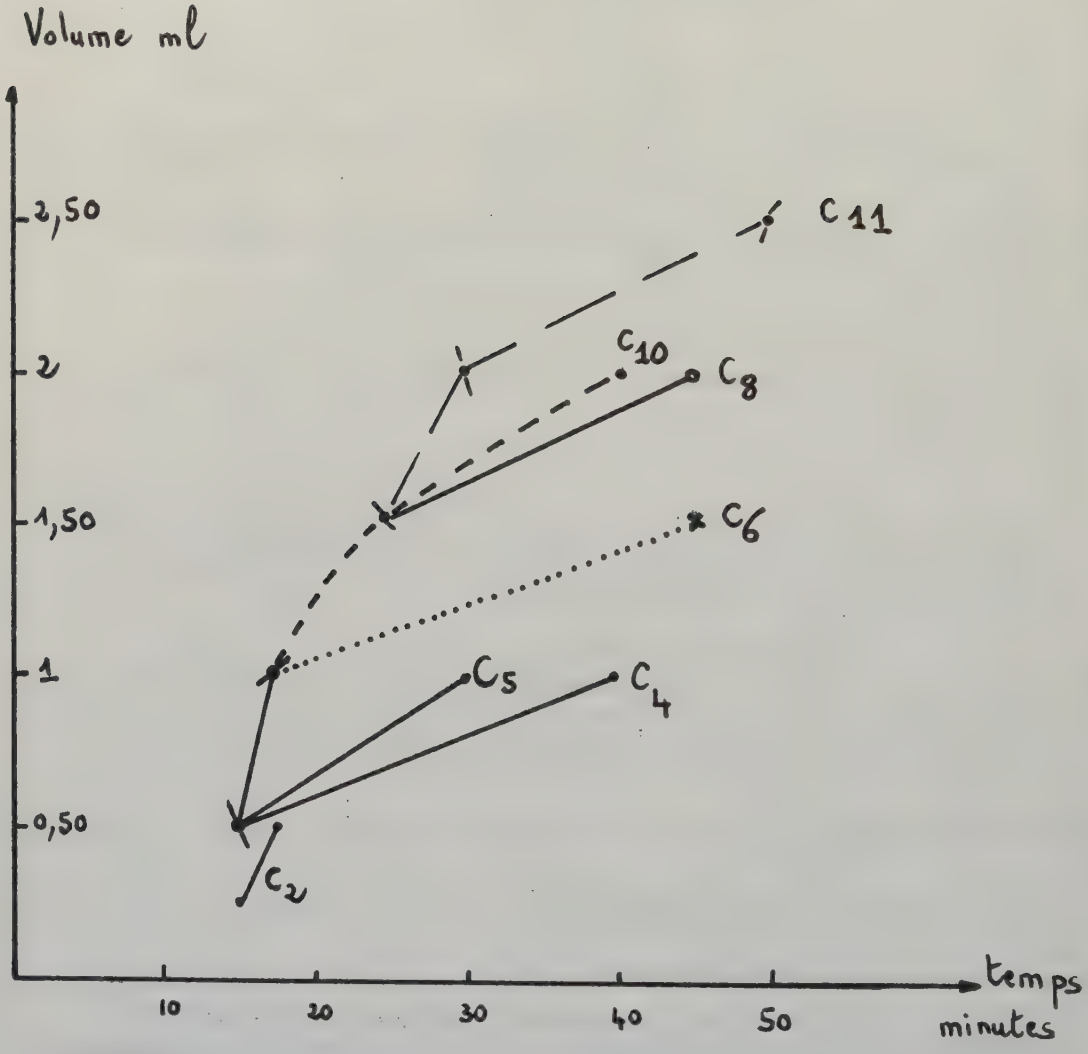


FIGURE N° 10 :

Cinétique de quelques alcools primaires aliphatiques
en fonction du volume ajouté à 4 ml de mélange réactionne

. *La cinétique* du développement de la réaction colorée dépend de deux facteurs étroitement liés : le volume de solvant ajouté et le nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule. Elle est d'autant plus lente que le nombre d'atomes de carbone augmente (fig. n°10).

Pour un volume égal à la moitié du volume limite susceptible de donner normalement la réaction, le maximum de coloration est atteint dans un délai régulièrement croissant avec la longueur de la chaîne carbonée, compris entre 15 minutes (pour le terme en C_1) et 30 minutes (pour le terme en C_{12}). La coloration est stable entre 5 et 7 minutes puis diminue lentement (4 à 5 % dans les 20 minutes suivantes).

Il est à noter que la réaction s'accompagne d'un dégagement de chaleur qui, pour un volume de solvant fixe, est inversement proportionnel à la masse moléculaire des différents composés.

- *Sur le plan quantitatif,*

le volume de solvant ajouté joue un rôle très important dans la nature et l'intensité de la coloration obtenue.

. *Nature de la coloration :*

Pour chaque solvant il existe un volume déterminé pour lequel la coloration bleue caractéristique ne se développe plus.
Nos résultats sont consignés dans le tableau n°2.

Ce volume est fonction :

- *du nombre d'atomes de carbone.*

Il est d'autant plus important que le nombre d'atomes de carbone est élevé (figure n°11). Il est assez remarquable de constater que pour les alcools primaires aliphatiques les points correspondants aux volumes d'inhibition de la coloration se situent sur une droite. Ce volume d'inhibition augmente d'environ 0,27 ml lorsqu'on considère un alcool donné et son homologue supérieur. Le point correspondant à C_0 coupe l'axe des ordonnées à 0,35 ml. Ce volume est le volume limite obtenu avec l'eau comme solvant qui effectivement correspond à la condensation en carbone nulle.

TABLEAU N° 2 - Volumes limites de développement de la réaction de Liebermann-Burchard pour l'ensemble des alcools étudiés (exprimés en ml)

ALCOOLS ALIPHATIQUES					*ALCOOLS CYCLIQUES*	*ETHER-ALCOOL*
MONO-ALCOOLS			*POLYOLS*			
C_1		0,65				
C_2		0,84	diol	0,42		1,24
C_3	Iaire	1,18	diol	0,56		
	IIaire	1,18	triol	0,40		
C_4	Iaire ISO	1,54	diol 1-4	0,68		
	IIaire	1,54	diol 1-3	0,68		
	IIIaire	0,72				
C_5	Iaire	1,74				
	IIaire ISO	1,74	diol 1-5	0,85	Cyclopentanol 1,38	
	III aire	0,82				
C_6	I aire	2,04				
	IIaire-2	2	diol 2-4	0,88	Cyclohexanol 1,70	
	-3	2,04				
C_7	Iaire	2,30				
	IIaire 3	2,30			Alcool benzylique 1,50	
C_8	Iaire	2,54				
	IIaire 2	2,54				
	3	2,54				
C_9		2,84				
C_{10}		3,10				
C_{11}		3,30				
C_{12}		3,64				

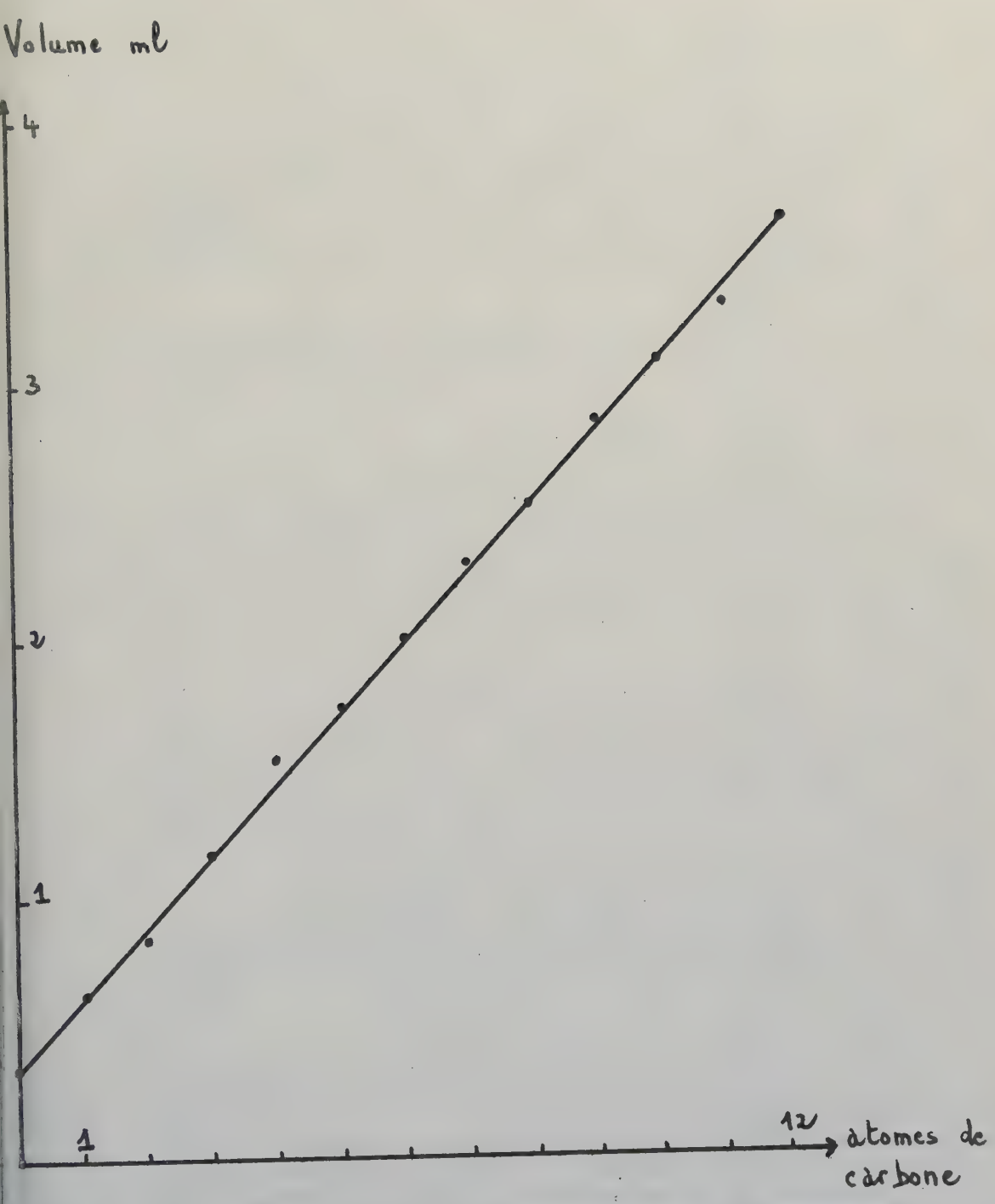


FIGURE N° 11 : Volumes limites de développement de la réaction de Liebermann-Burchard des alcools primaires aliphatiques. (4 ml de mélange réactionnel).

- *de la classe de l'alcool.*

  . *fonction alcool secondaire :* Pour un alcool donné le comportement des alcools primaires et secondaires est identique. Le volume limite est le même (voir tableau n°2) quelle que soit la position de la fonction alcool secondaire.

  . *fonction alcool tertiaire :* Pour le terbutanol et le pentanol tertiaires, ce volume est sensiblement égal à la moitié de celui de l'alcool primaire correspondant.

- *du nombre de fonctions "alcool".*

  D'une manière générale, plus le nombre de fonctions "alcool" augmente, plus le volume de solvant permettant le développement de la réaction colorée est faible (voir tableau n°2). Ce volume limite est égal à la moitié de celui de l'alcool primaire pour les diols, au tiers de celui de l'alcool primaire pour le glycérol.

- *de la présence d'un cycle dans la molécule.*

  Que le cycle soit cyclanique (cyclopentanol et cyclohexanol) ou aromatique (alcool benzylique), ce volume limite réactionnel diminue nettement par rapport à celui obtenu avec leur homologue linéaire (voir tableau n°2).

- *de la présence de plusieurs fonctions.*

  Le volume limite obtenu pour l'éther monométhylique de l'éthylène glycol est légèrement supérieur à celui obtenu pour le propanol (terme en C_3).

. *Sensibilité de la coloration obtenue :*

Les résultats sont consignés dans les tableaux 3a et 3b et dans la figure 12. On observe que :

- *dans une même classe d'alcools,* par exemple la série des alcools primaires, la sensibilité apparente augmente en fonction du nombre d'atomes de carbone (tableau 3a).

- *les isomères autres que fonctionnels* (ramification et position de la fonction alcool dans la chaîne) influencent légèrement la sensibilité. (tableau 3b et figure 12).

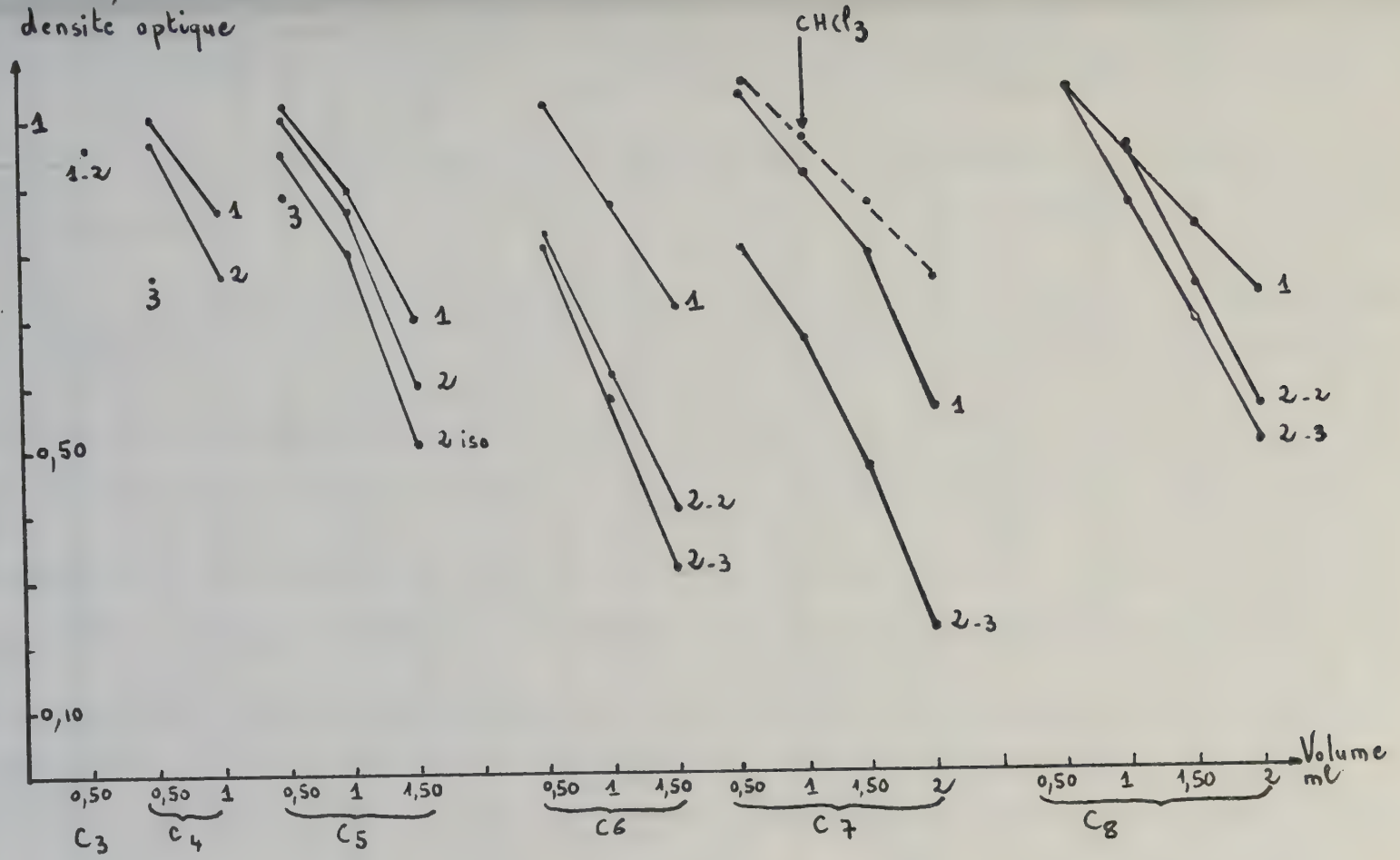


FIGURE N° 12 : Sensibilités de quelques alcools primaires aliphatiques en fonction de la nature et de la position de la fonction alcool comparées à celle du chloroforme.

TABLEAU N° 3A - Sensibilités de quelques alcools primaires aliphatiques comparées à celle du chloroforme

Volume ajouté à 4ml de M.R.	$CHCl_3$		C_2		C_3		C_4		C_5		C_6		C_7		C_8		C_{10}	
	D.O.		D.O.		D.O.		D.O.		D.O.		D.O.		D.O.		D.O.		D.O.	
	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.	Exp.	Th.
0,50 ml	1,06	0,94	0,96		0,96		1	0,89	1,02	0,92	1,03	0,93	1,04	0,94	1,04	0,94	1,06	0,95
* 1ml référence	0,96	0,96					0,86	0,86	0,88	0,88	0,88	0,88	0,90	0,90	0,94	0,94	0,94	0,94
1,50 ml	0,87	0,96							0,68	0,75	0,76	0,84	0,78	0,88	0,81	0,90	0,86	0,95
2 ml	0,81	0,97											0,54	0,65	0,68	0,82	0,78	0,94

La D.O. théorique est calculée en tenant compte de la dilution apportée par le volume de solvant introduit. La D.O. obtenue pour un volume de solvant de 1ml dans un volume final de 5ml étant prise comme référence.

TABLEAU N° 3 B - Densités Optiques obtenues pour les alcools en fonction du nombre d'atomes de carbone, de la nature, de la position et du nombre de fonctions alcools.

	0,20 ml	*0,50 ml*	*1 ml*	*1,50 ml*	*2 ml*
C_2					
Ethanol	1,08	0,96			
Ethane diol	1,06				
C_3					
Propanol 1	1,08	0,96	0,84		
Isopropanol	1,08	0,96	0,84		
Propane diol	1,08	0,90			
Glycérol	1,06	-			
Ether monométhylique Ethylène glycol	1,06	0,94			
C_4					
Butanol 1	1,08	1	0,85		
Isobutanol	1,07	1	0,86		
Butanol 2	1,08	0,96	0,76		
Terbutanol	1,06	0,76			
Butane diol	1,06	0,76			
C_5					
Pentanol 1	1,08	1,02	0,88	0,68	
Pentanol 2	1,08	1,02	0,84	0,58	
Isoamylique	1,06	0,96	0,78	0,44	
Pentanol tertiaire	1,04	0,88	-	-	
Cyclopentanol	1,03	0,88	0,58	-	
Pentane diol	1,06	0,98			

	0,20 ml	0,50 ml	1 ml	1,50 ml	2 ml
C_6					
Hexanol 1	1,08	1,03	0,88	0,76	
Hexanol 2	1,08	0,82	0,60	0,39	
Hexanol 3	1,06	0,81	0,56	0,30	
Méthyl-4 pentanol 2	1,06	0,96	0,78	0,58	
Cyclohexanol	1,05	0,90	0,66	0,36	
Méthyl pentane diol 2-4	1,06	0,93	-	-	
C_7					
Heptanol 1	1,08	1,04	0,90	0,78	0,54
Heptanol 3	1,06	0,80	0,66	0,46	0,20
Alcool benzylique	1,04	0,88	0,72	-	-
C_8					
Octanol 1	1,08	1,04	0,94	0,81	0,68
Octanol 2	1,07	1,04	0,94	0,76	0,54
Octanol 3	1,08	1,04	0,86	0,67	0,46

. sur trois exemples d'isomères linéaires et ramifiés (alcools en C_4, C_5 et C_6) la ramification conduit pour les alcools en C_5 et C_6 à une sensibilité inférieure dont la différence est d'autant plus accusée que le volume introduit est plus grand.
Pour l'alcool en C_4, la sensibilité est identique.

. sur deux exemples d'isomères de position (alcools en C_5 et C_6, alcools secondaires en position 2 et 3) la position 2 conduit à une sensibilité supérieure.

Ces résultats qui nous semblaient sujets à caution en raison de la faible différence observée ont été vérifiés à plusieurs reprises.

- *la classe de l'alcool* exerce une influence sur la sensibilité apparente. Celle-ci diminue lorsqu'on passe d'un alcool primaire à son homologue secondaire et également du dérivé secondaire au dérivé tertiaire, à l'exception des alcools en C_3.
- *le nombre* de fonctions "alcool" n'entraine pas une perte de sensibilité très importante.
- *la présence d'un cycle* conduit à une sensibilité inférieure par rapport à celle obtenue avec l'homologue linéaire.
- *l'association de la fonction alcool* à une autre fonction n'influence pas la sensibilité.

2. Les acides carboxyliques. Etude de l'acide acétique.

La coloration obtenue avec ce solvant est bleue (λ max 615 nm). La cinétique du développement de la réaction est fonction du volume de solvant ajouté. Elle est d'autant plus rapide que le volume ajouté est faible. La coloration est encore perceptible pour un volume de 4 ml, au-delà de ce volume on n'observe plus de coloration.

AUTRES SOLVANTS A FONCTION OXYGENEE.

a) Produits étudiés. Nous avons étudié :

- *des éther-oxydes*, soit linéaire (l'éther éthylique), soit cyclique (le dioxanne).
- *des esters :* formiate, acétate et diéthylmalonate d'éthyle, acétate d'isoamyle.
- *une cétone :* l'acétone.
- *des acétals:*
  - . dérivés du formaldéhyde : le formaldéhyde diméthylacétal ou méthylal.
  - . dérivés de l'acétaldéhyde :

    acétaldéhyde diméthyl acétal,

    acétaldéhyde diéthyl acétal,

    méthylamino diméthyl acétal,

    phénylacétaldéhyde diméthylacétal.
- *un sulfoxyde :* le diméthylsulfoxyde.

b) Résultats :

- Ether-oxydes.

. Sur le plan qualitatif :

Avec ces solvants, on obtient une coloration bleue dont le maximum d'absorption se situe à 615 nm. Pour des volumes importants, la coloration bleue est remplacée par une coloration verte (λ max 590 nm).

La cinétique de la réaction colorée (figure n°13) est fonction :

- du volume de solvant ajouté : plus il est grand, plus elle est lente.
- la nature de l'éther-oxyde : le dioxanne présente une cinétique plus rapide que l'éther.

. Sur le plan quantitatif :

L'éther et le dioxanne possèdent une grande miscibilité avec le mélange réactionnel. Dans les conditions

opératoires choisies (concentration en cholestérol), au-delà d'un certain volume, la réaction colorée ne se développe plus de manière quantifiable. Ce volume est de 2 ml pour l'éther et de 4 ml pour le dioxanne.

C'est pourquoi, pour un volume donné, le dioxanne donne une coloration plus intense que l'éther mais cependant très inférieure à celle obtenue avec le chloroforme (tableau n°4 et figure 14).

- *Les esters.*

- *Le comportement des quatre esters étudiés* est identique tant sur le plan spectral et cinétique que sur le plan de la sensibilité.

- *La coloration obtenue est bleue* et présente un maximum d'absorption à 615 nm. Elle évolue vers le vert (λ max 600 nm) pour des volumes de solvants importants. Le volume de solvant conditionne la cinétique de la réaction (figure n°15). Un volume de 5 ml permet le développement d'une coloration encore quantifiable.
L'intensité de la coloration obtenue est plus faible que celle obtenue avec le chloroforme (figure 16 et tableau n°5).

- *L'acétone.*

. *La coloration obtenue* avec l'acétone varie en fonction du volume de solvant ajouté.
Elle est bleue pour les volumes inférieurs à 0,50 ml, jaune verdâtre pour des volumes compris entre 0,50 ml et 1 ml, jaune à partir de 1 ml.

. *La cinétique* est comparable à celle obtenue avec le chloroforme mais l'intensité de la coloration est très faible (figure 14).

- *Les acétals.*

Dans cette étude, il faut dissocier le comportement :

- du méthylal,
- du méthylaminoacétaldéhyde-diméthylacétal,
- des trois autres acétals étudiés.

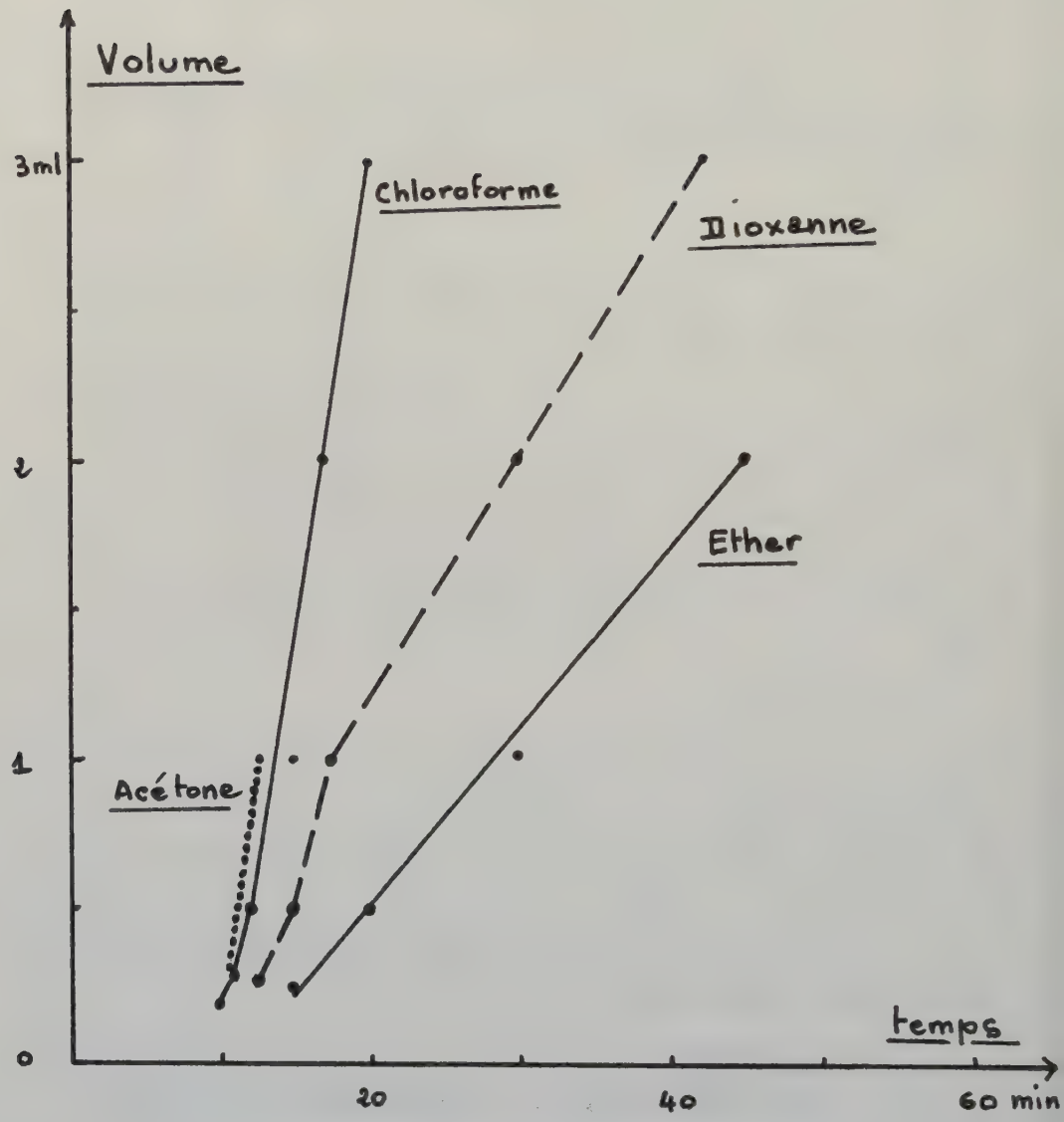


FIGURE N° 13 :

Cinétiques comparées des ether-oxydes et du chloroforme en fonction du volume ajouté à 4 ml de mélange réactionnel.

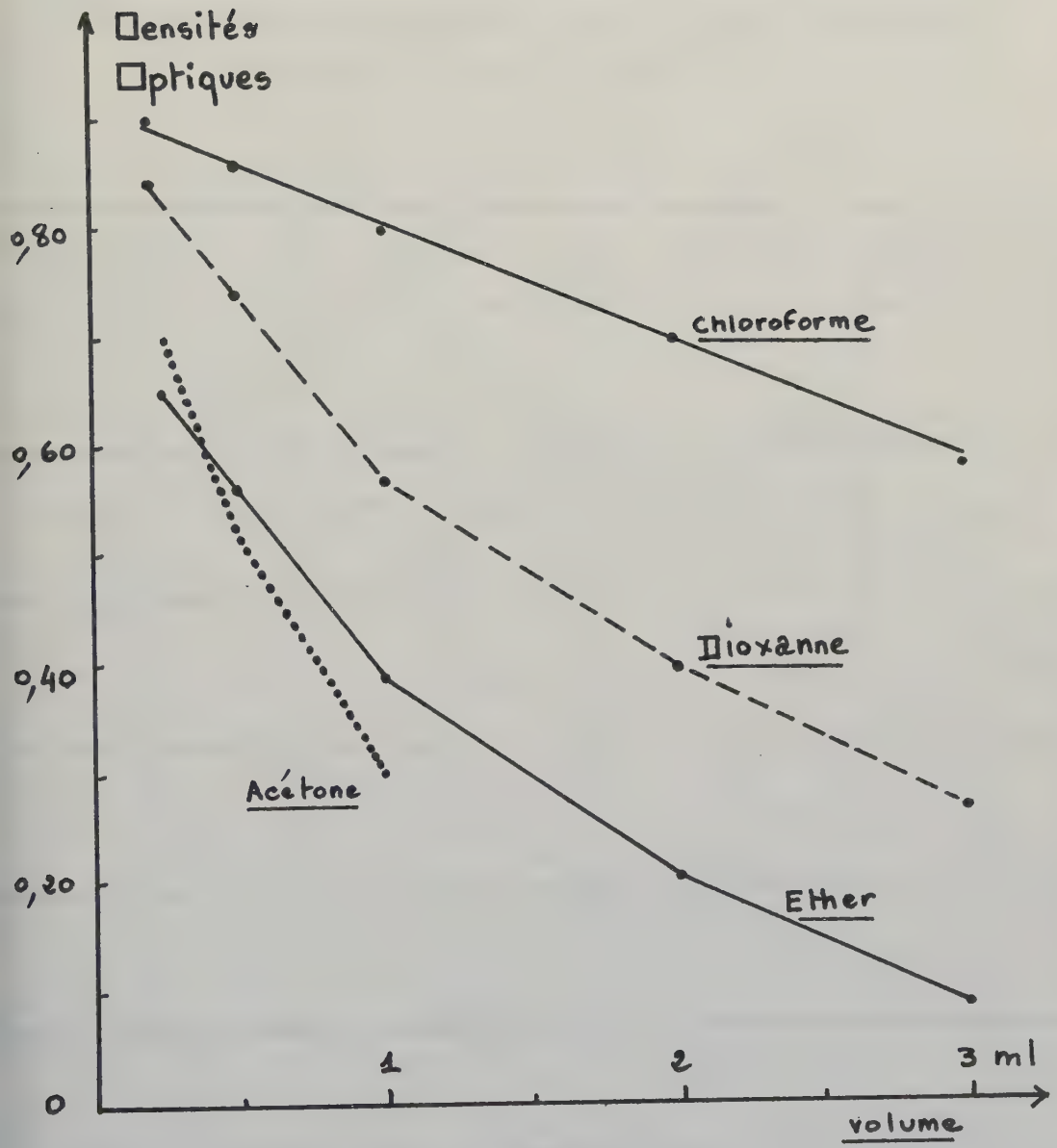


FIGURE N° 14 :

Sensibilités comparées des ether-oxydes et du chloroforme en fonction du volume ajouté à 4 ml de mélange réactionnel.

TABLEAU N° 4 - Sensibilités de quelques éther-oxydes comparées à celle du chloroforme (exprimées en D.O.)

Volume ajouté à 4ml de M.R.	*CHLOROFORME*		*DIOXANNE*		*ETHER*	
	D.O.		*D.O.*		*D.O.*	
	Exp.	*Th.*	*Exp.*	*Th.*	*Exp.*	*Th.*
0,50 ml	0,86	0,78	0,74	0,67	0,57	0,51
1 ml *référence	0,80	0,80	0,57	0,57	0,39	0,39
2 ml	0,69	0,83	0,40	0,48	0,20	0,24
3 ml	0,58	0,81	0,28	0,39	0,89	0,13

La D.O. théorique est calculée en tenant compte de la dilution apportée par le volume de solvant introduit. La D.O. obtenue pour un volume de solvant de 1ml dans un mélange de 5ml étant prise comme référence.

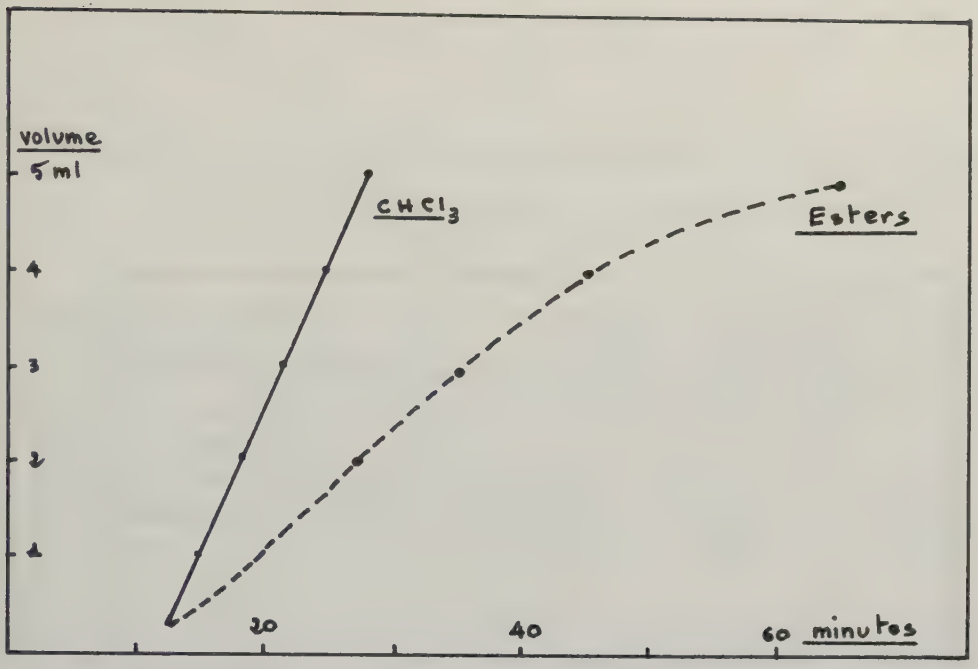


FIGURE N° 15 : Cinétiques comparées des esters et du chloroforme en fonction du volume ajouté à 4 ml de mélange réactionnel.

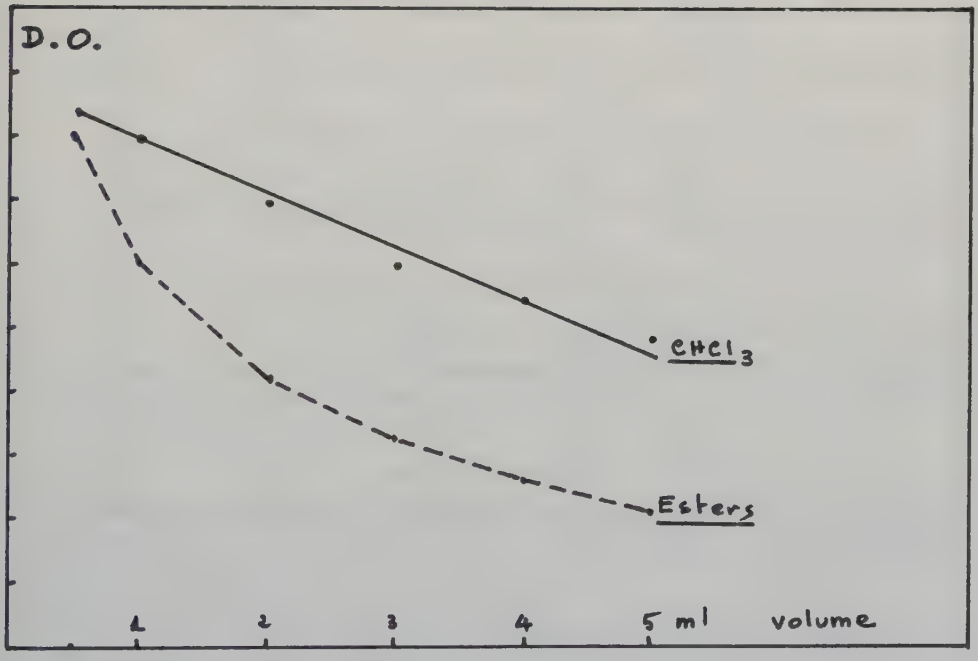


FIGURE N° 16 : Sensibilités comparées des esters et du chloroforme en fonction du volume ajouté à 4 ml de mélange réactionnel.

TABLEAU N° 5 - Sensibilités des esters comparées à celle du chloroforme (exprimées en D.O.)

Volume ajouté à 4ml de M.R.	*CHLOROFORME*		*ESTERS*	
	D.O.		*D.O.*	
	Exp.	*Th.*	*Exp.*	*Th.*
1 ml * référence	0,80	0,80	0,61	0,61
2 ml	0,69	0,83	0,42	0,50
3 ml	0,58	0,81	0,32	0,45
4 ml	0,54	0,86	0,26	0,42
5 ml	0,48	0,86	0,21	0,38

La D.O. théorique est calculée en tenant compte de la dilution apportée par le volume de solvant introduit. La D.O. obtenue pour un volume de solvant de 1ml dans un mélange final de 5ml étant prise comme référence.

. *le méthylal :*

+ sur le plan qualitatif :

- *L'évolution spectrale* de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD avec ce solvant est tout à fait particulière. La réaction se développe très rapidement en donnant successivement une coloration rose qui vire presque instantanément au rose violet, violet (λ max 550 nm) puis au bleu (λ max 615 nm). Si on augmente le volume de solvant, on observe une évolution spectrale inverse : la coloration bleue est remplacée par une coloration violette (λ max 570 nm pour un volume de 1,30 ml) puis rosée (λ max 495 nm pour un volume de 1,50 ml).

- *La cinétique réactionnelle à 615 nm* est très rapide. Quel que soit le volume de solvant ajouté, le maximum de densité optique est atteint en 9 minutes. La coloration demeure stable de la neuvième minute à la treizième minute puis elle diminue lentement.
Cette diminution est d'autant plus marquée que le volume de solvant est important : au bout de 30 minutes elle est égale à :

20 % pour des volumes de 0,10 à 0,20 ml,

10 % pour des volumes de 0,50 ml,

7 % pour des volumes de 1 ml.

+ sur le plan quantitatif :

Dans les conditions expérimentales choisies, le volume limite pour lequel la réaction de Liebermann (coloration bleue) se développe est de 1,20 ml. Pour la coloration rose, il faut atteindre un volume de 3 ml.

La coloration obtenue est très intense. Elle passe par un maximum pour des volumes de 0,20 à 0,30 ml. Comparée à celle obtenue avec le chloroforme, elle présente une sensibilité très supérieure pour des volumes inférieurs à 1,50ml (figure n°17).

. *le méthylamino-acétaldéhyde diméthylacétal :*

+ sur le plan qualitatif :

On obtient avec ce solvant une coloration bleue *immédiate*. Le maximum d'absorption se situe à 615 nm.

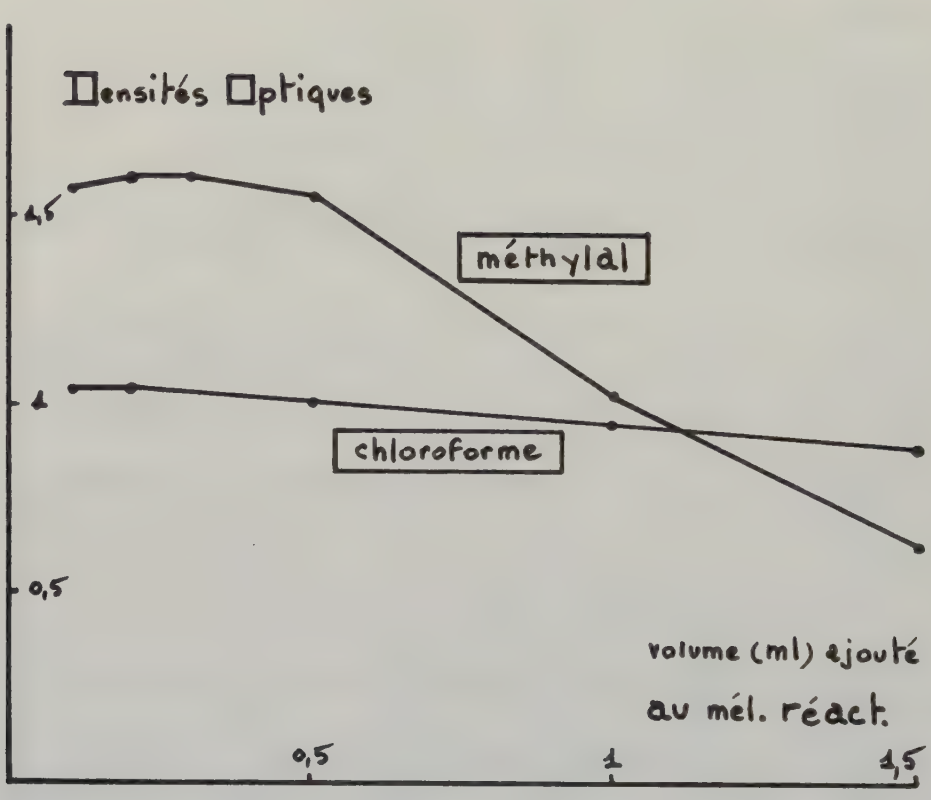


FIGURE N° 17 : Sensibilités comparées du méthylal et du chloroforme
fonction du volume ajouté à 4 ml de mélange réaction

La cinétique et la stabilité de la réaction sont identiques à celles du méthylal.

+ sur le plan quantitatif :

Contrairement aux autres solvants étudiés, cet acétal donne avec le mélange réactionnel des témoins colorés en jaune orangé. Leurs intensités augmentent en fonction du volume ajouté. Cette coloration s'additionne à la coloration bleue de la réaction de Liebermann, rendant impossible les lectures au-dessus d'un volume égal à 0,50 ml. Ceci explique la faible intensité de la coloration obtenue avec ce solvant comparativement à celle développée par le méthylal et le chloroforme.

. *Les autres acétals.*

En présence de mélange réactionnel très acide, ces solvants subissent une hydrolyse. Quel que soit le volume ajouté, les témoins se colorent en marron très intense.

- *Le Diméthylsulfoxyde :*

Il est très difficile de dissoudre avec ce solvant le résidu d'évaporation chloroformique. La coloration bleue (λ max 615 nm) est obtenue pour des volumes inférieurs à 0,60 ml. La cinétique est très lente (densité optique maxima entre 45 minutes et 60 minutes) et la sensibilité très faible.

HYDROCARBURES.

- *Hydrocarbures :* 3 aliphatiques (pentane - hexane et heptane) et 2 alicycliques (éther de pétrole et cyclohexane).

On obtient avec ces solvants la coloration bleue caractéristique de LIEBERMANN (λ max 615 nm). Le maximum est atteint en 15 minutes et se maintient pendant 30 minutes.Mais pour des volumes supérieurs à 0,20 ml, ils ne sont plus miscibles avec le mélange réactionnel.

- *Hydrocarbures aromatiques :* benzène, toluène,xylène.

. *Sur le plan qualitatif :*

- L'allure spectrale de la réaction colorée obtenue avec les hydrocarbures aromatiques est la même. Le maximum d'absorption se situe à 615 nm.

- La cinétique et la stabilité de la réaction sont tout à fait comparables à celles obtenues avec le chloroforme.

. *Sur le plan quantitatif :*

Pour des volumes respectivement égaux à :

. 1,90 ml pour le benzène,

. 1,05 ml pour le xylène,

. 0,90 ml pour le toluène,

Ces solvants ne sont plus miscibles avec le mélange de FERRO.

Le benzène et le toluène donnent des intensités de coloration identiques et égales à celles obtenues avec le chloroforme. La sensibilité avec le xylène est légèrement inférieure (5 % pour un volume de 0,20 ml ; 10 % pour un volume de 0,50 ml)

SOLVANTS AZOTES.

Nous avons choisi la pyridine et le diméthylformamide. *La coloration obtenue* avec ces deux solvants est bleue (λ max 615 nm). Lorsque le volume de solvant ajouté augmente, elle est remplacée par une coloration verte (λ max 630 nm). Au-delà de 0,90 ml, on n'observe plus de coloration.

La cinétique est identique à celle obtenue avec le chloroforme pour la pyridine, beaucoup plus lente pour le diméthylformamide.
La sensibilité est très inférieure à celle obtenue avec le chloroforme. La pyridine conduit cependant à une sensibilité supérieure à celle obtenue avec le diméthylformamide.

III. DISCUSSION DES RESULTATS.

L'expérience nous montre très nettement qu'il y a lieu de distinguer dans la discussion des résultats :

- d'une part le comportement des solvants chlorés et hydroxylés (eau et alcools).
- d'autre part celui des autres solvants.

A. *SOLVANTS CHLORES ET HYDROXYLES.*

- *SOLVANTS CHLORES.*

- *Sur le plan qualitatif.*

Ces solvants lipophiles réagissent très bien sur le cholestérol dans le mélange de FERRO. Le volume de solvant permettant le développement de la réaction colorée est illimité pour le chloroforme, le dichlorométhane et le dichloréthane. Le gradient de miscibilité pour les autres solvants semble être en relation inverse avec le nombre de substituants : Trichloréthane > Trichloréthylène > Tétrachlorure de carbone.
Ce dernier est apolaire, il possède le plus faible degré de miscibilité.

- *Sur le plan quantitatif.*

Nous avons vu que l'intensité de la coloration obtenue avec ces solvants est uniquement fonction de la dilution apportée par le volume de solvant introduit dans le mélange réactionnel (voir tableau n°1).

Leur influence sur le développement de la réaction de Liebermann-Burchard tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif est donc nulle.

Disposant d'un solvant parfaitement inerte ne développant en particulier aucun effet thermique, il nous a paru intéressant de préciser l'influence de deux des constituants du mélange réactionnel classique : l'anhydride acétique et l'acide sulfurique sur la cinétique et la sensibilité réactionnelles.

- *Influence de la concentration en anhydride acétique.*

Nous avons constitué une série de mélanges réactionnels comportant une quantité fixe d'acide sulfurique et un rapport anhydride acétique/acide acétique variable. La composition des différents mélanges réactionnels est schématisée dans le tableau n°6. Le gradient de variation considéré est la proportion d'anhydride acétique par rapport à la somme anhydride acétique - acide acétique.

1. Sur le plan qualitatif.

- *Allure spectrale :* la coloration obtenue avec les mélanges 1 à 12 est bleue, le maximum d'absorption se situe à 615 nm.

La coloration obtenue avec les mélanges 13 et 14 est rose, le maximum d'absorption se situe à 485 nm.

Le passage de la coloration bleue à la coloration rose s'effectue pour une concentration en anhydride acétique égale à 12 % (mélange 13).

- *Cinétique :*

+ *à 615 nm.* Elle est d'autant plus rapide que la concentration en anhydride acétique est importante (figure n°18).
La stabilité de la coloration obtenue est au contraire inversement proportionnelle à celle-ci. Les mélanges 9 et 10 conduisent à une stabilité très grande : 35 minutes pour le mélange 9, 60 minutes au moins pour le mélange 10.

+ *à 485 nm.* La vitesse de réaction est d'autant plus rapide que la concentration en anhydride acétique est importante, mais de façon moins nette que 615 nm.

2. Sur le plan quantitatif.

L'intensité de la coloration bleue est variable en fonction de la concentration en anhydride acétique.Elle passe par un maximum pour une concentration égale à 70 % (figure n°19).

- *Influence de la concentration en acide sulfurique.*

Pour les trois types de mélange A, B et C comportant un rapport anhydride acétique - acide acétique fixe, nous avons fait varier la concentration en acide sulfurique. La composition des différents mélanges réactionnels est résumée dans le tableau n°7.

TABLEAU N° 6 - Influence de la concentration en anhydride acétique : composition des différents mélanges réactionnels (exprimée en ml)

MELANGES N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ANHYDRIDE ACETIQUE	10	9	8	7	6	5,5	5	4	3	2	1,4	1,3	1,2	1
ACIDE ACETIQUE	0	1	2	3	4	4,5	5	6	7	8	8,6	8,7	8,8	9
ACIDE SULFURIQUE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$\frac{\text{ANHYD. ACET.}}{\text{ANHYD. AC + ACIDE ACETIQUE}} \times 100$	100	90	80	70	60	55	50	40	30	20	14	13	12	10

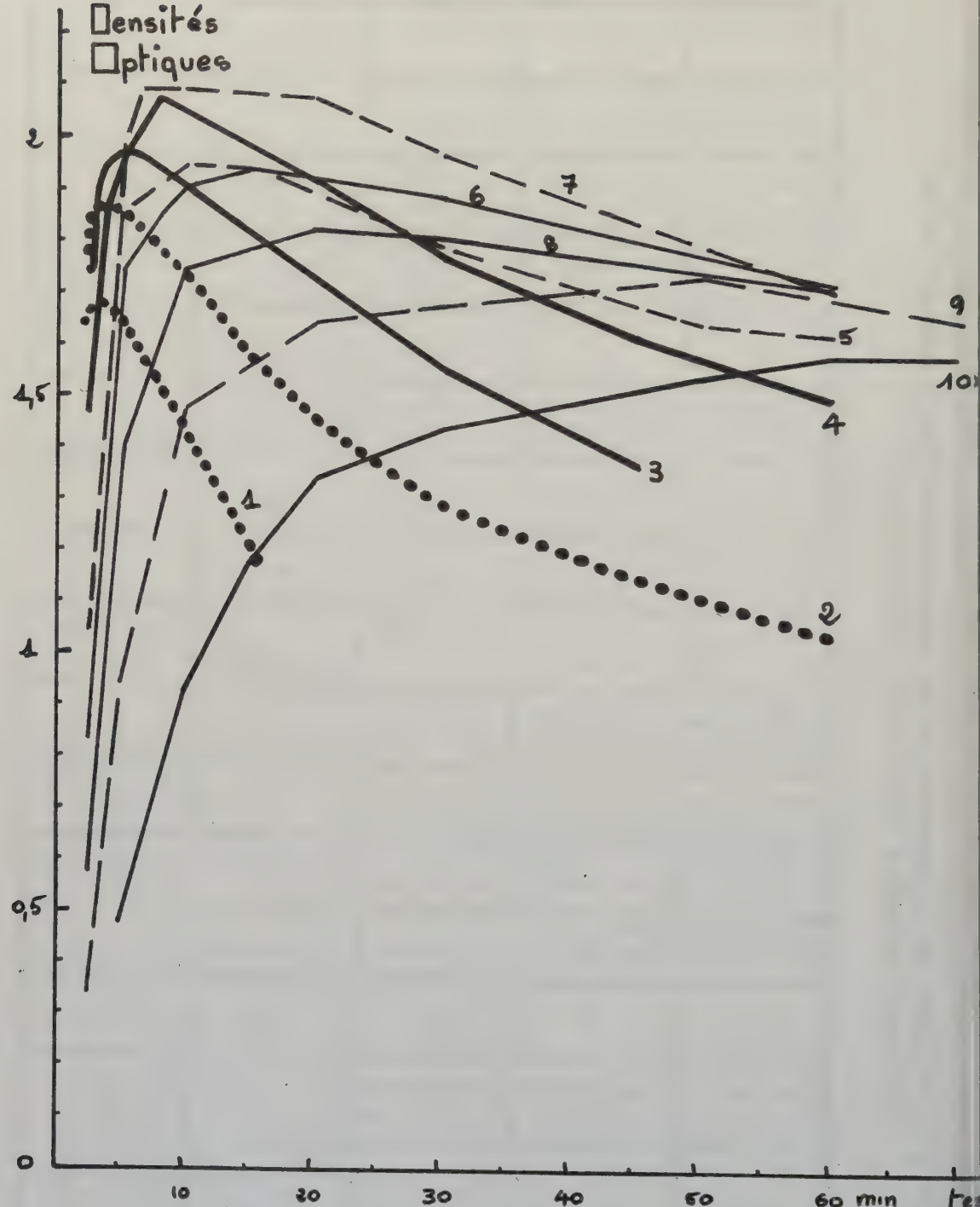


FIGURE N° 18 : Cinétique en fonction de la concentration en anhydri
acétique. (mélanges 1 à 10. Tableau n° 6)

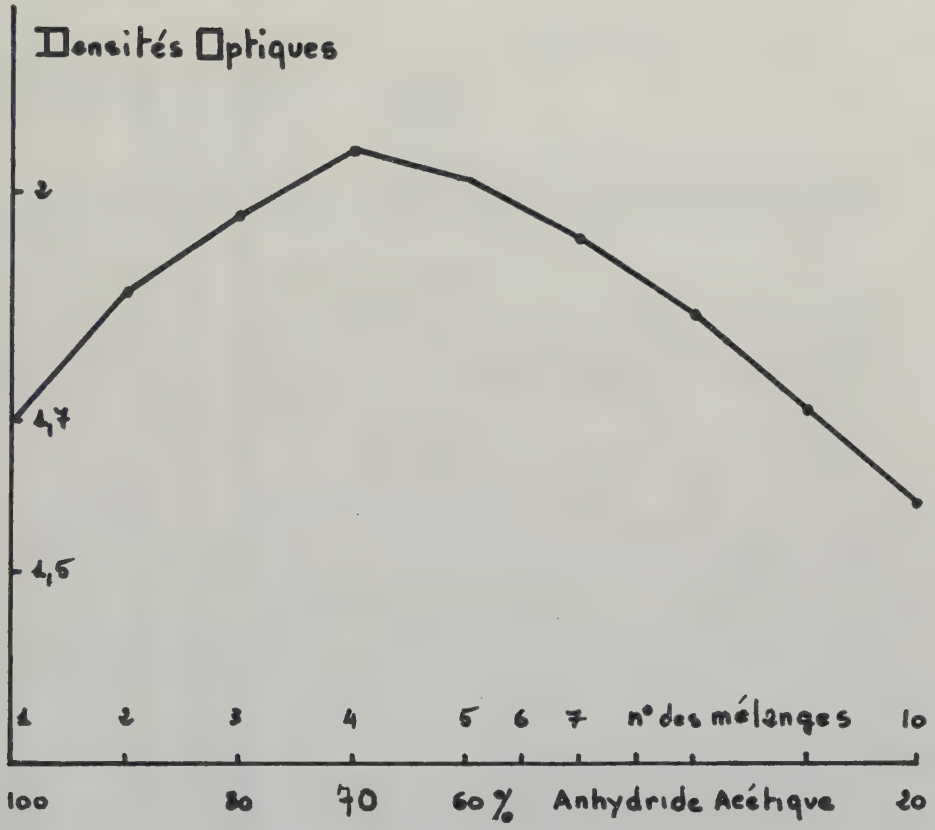


FIGURE N° 19 : Sensibilité en fonction de la concentration en anhydride acétique.

TABLEAU N° 7 - Influence de la concentration en acide sulfurique : composition des mélanges A, B et C (exprimée en ml)

A	*ANHYDRIDE ACETIQUE 55ml - ACIDE ACETIQUE 45ml*							
	I	*II*	*III*	*IV*	*V*	*VI*	*VII*	*VIII*
Mélange A	11,5	11	10,50	10	9,50	9	8	7,50
$H_2\ SO_4$	0,5	1	1,50	2	2,50	3	4	4,50
$\frac{\text{Anhydre acétique}}{\text{Anhy.Ac.} + CH_3\ COOH} \times 100$	53,25	60,5	57,7	55	52,25	47,50	44	40,25
$H_2\ SO_4$ p.100 dans M.R. final	4,16	8,33	12,60	16,66	21	15	33,33	37,8

B	*ANHYDRIDE ACETIQUE 20ml - ACIDE ACETIQUE 80ml*					
	I	*II*	*III*	*IV*	*V*	*VI*
Mélange B	11,5	10	9,50	9,00	8,50	8,00
$H_2\ SO_4$	0,5	2	2,5	3	3,5	4
$\frac{\text{Anhydride acétique}}{\text{Anhy.Acé.} + CH_3COOH} \times 100$	23	20	19	18	17	16
$H_2\ SO_4$ p.100 dans M.R.final	4,16	16,66	21	25	29	33,33

C	*ANHYDRIDE ACETIQUE 40ml - ACIDE ACETIQUE 60ml*			
	a	*b*	*c*	*d*
Mélange C	11	10	9	8
$H_2\ SO_4$	1	2	3	4
$\frac{\text{Anhyd. Acét.}}{\text{Anhyd. Ac.} + CH_3COOH} \times 100$	44	40	36	32
$H_2.SO_4$ p.100 dans M.R.final	8,33	16,66	25	33,33

1. sur le plan qualitatif.

- *allure spectrale.* L'allure du spectre d'absorption varie en fonction de la teneur en acide sulfurique du mélange réactionnel.

Pour des concentrations comprises entre 16,6 % (B_{II} et C_b) et 21 % (A_{VIII}) la coloration obtenue est bleue avec un maximum d'absorption à 615 nm.

Pour des concentrations égales à 21 % (B_{III}) et 25 % (A_V et C_c) on observe deux maximum d'absorption situées à 485 nm et 615 nm. La coloration est alors bleue-verte.

Pour une concentration égale à :

- 33 %. Les mélanges A^{VII} et C_d donnent des colorations gris-violet. Le spectre d'absorption présente trois maximum d'absorption situés respectivement à 615, 550 et 485 nm avec prédominance du pic à 485 nm.
- 29 %. Le mélange B^V très pauvre en anhydride acétique, développe une intense coloration rose (λ max 510 nm). Le pic correspond à la coloration obtenue dans la réaction de SALKOWSKI. On constate de manière logique que le passage de la coloration bleue (LIEBERMANN- BURCHARD) à la coloration rose (SALKOWSKI) s'effectue pour une concentration en acide sulfurique inversement proportionnelle à la concentration en anhydride acétique.

- *Cinétique.*

Les cinétiques réactionnelles des différents mélanges sont schématisées dans les figures n°20, 21 et 22. On constate que dans les mélanges A, B, C, la vitesse de réaction augmente avec la teneur en acide sulfurique. Ce résultat est d'autant plus probant que parallèlement au gradient d'acide sulfurique, on a dans chaque série des mélanges A, B ou C un gradient inverse en anhydride acétique qui, comme nous venons de le préciser, doit freiner la vitesse de développement de la réaction.

2. Sur le plan quantitatif.

- *La figure n°23 représente* les courbes de sensibilité obtenues par les trois mélanges A, B, C, en fonction de la concentration en acide sulfurique. Le maximum de sensibilité est atteint pour 2,5 volumes (21 %) pour le mélange B, 3 volumes (25 %) pour A et C.

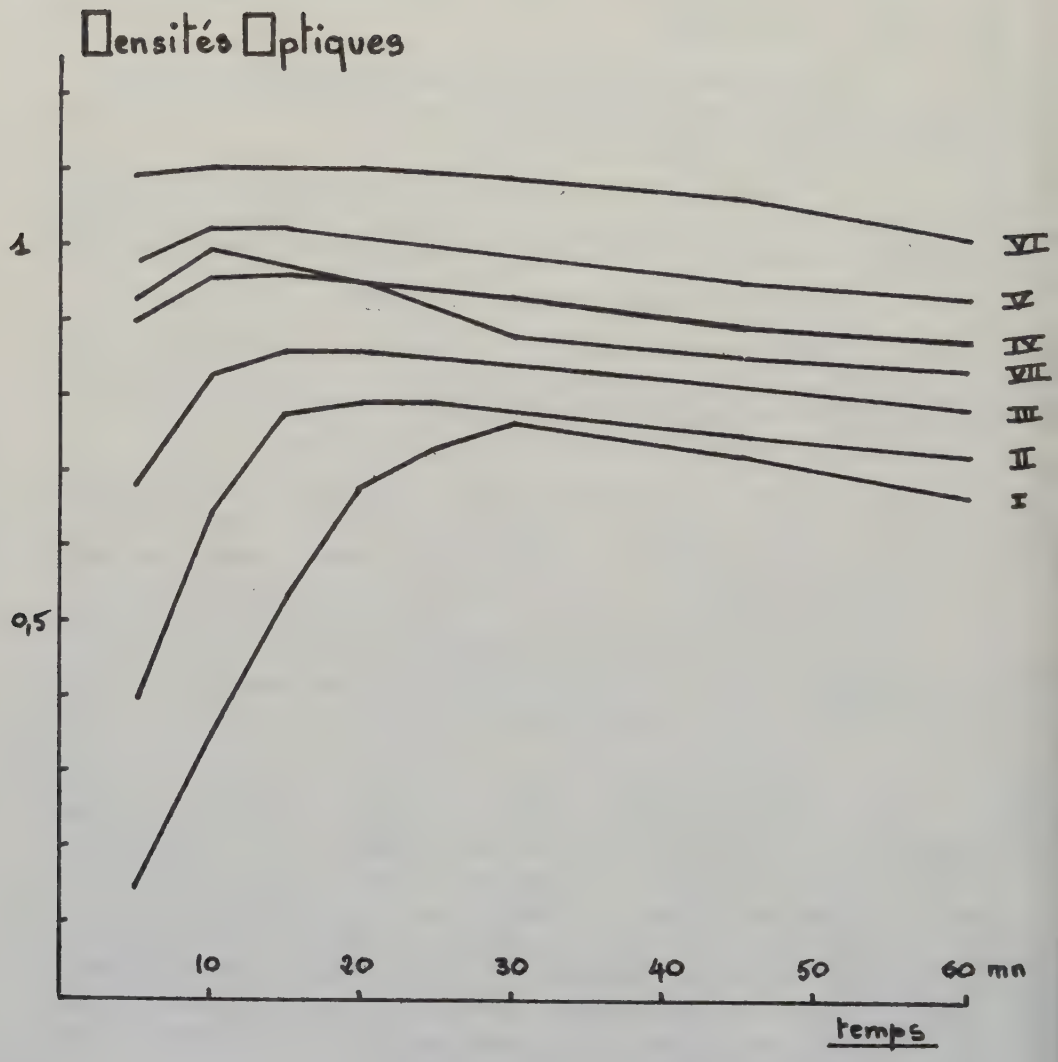


FIGURE N° 20 : Cinétique en fonction de la concentration en acide sulfurique. (mélange A).

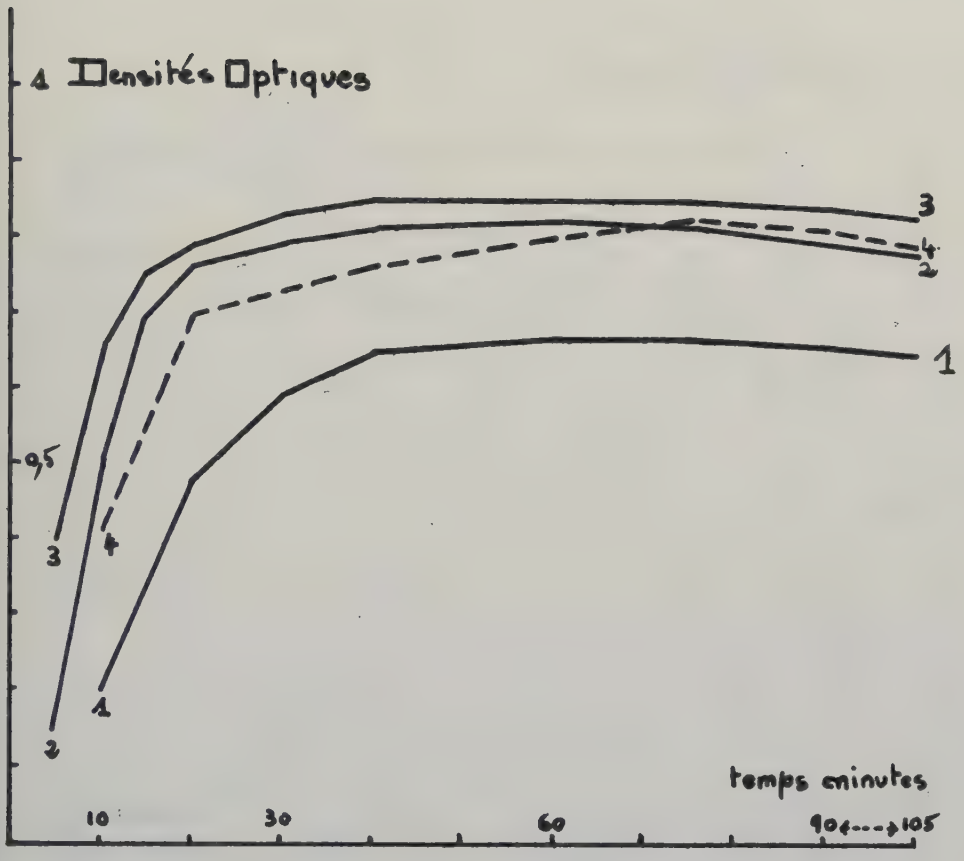


FIGURE N° 21 : Cinétique en fonction de la concentration en acide sulfurique. (mélange B).

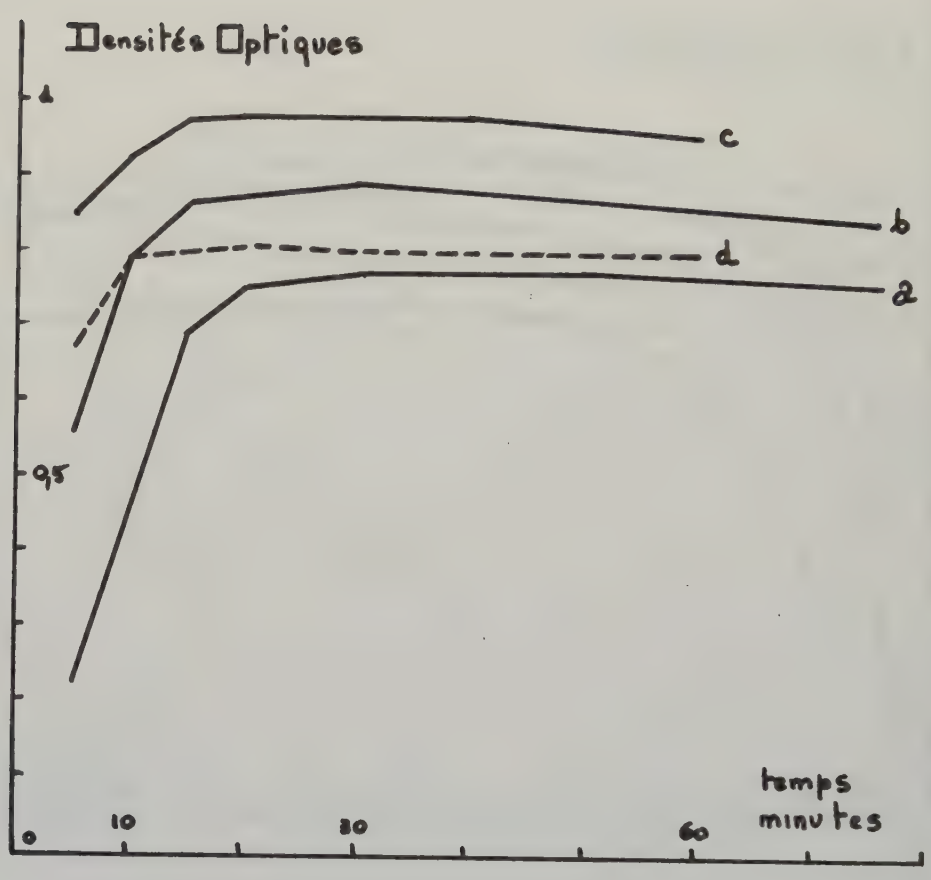
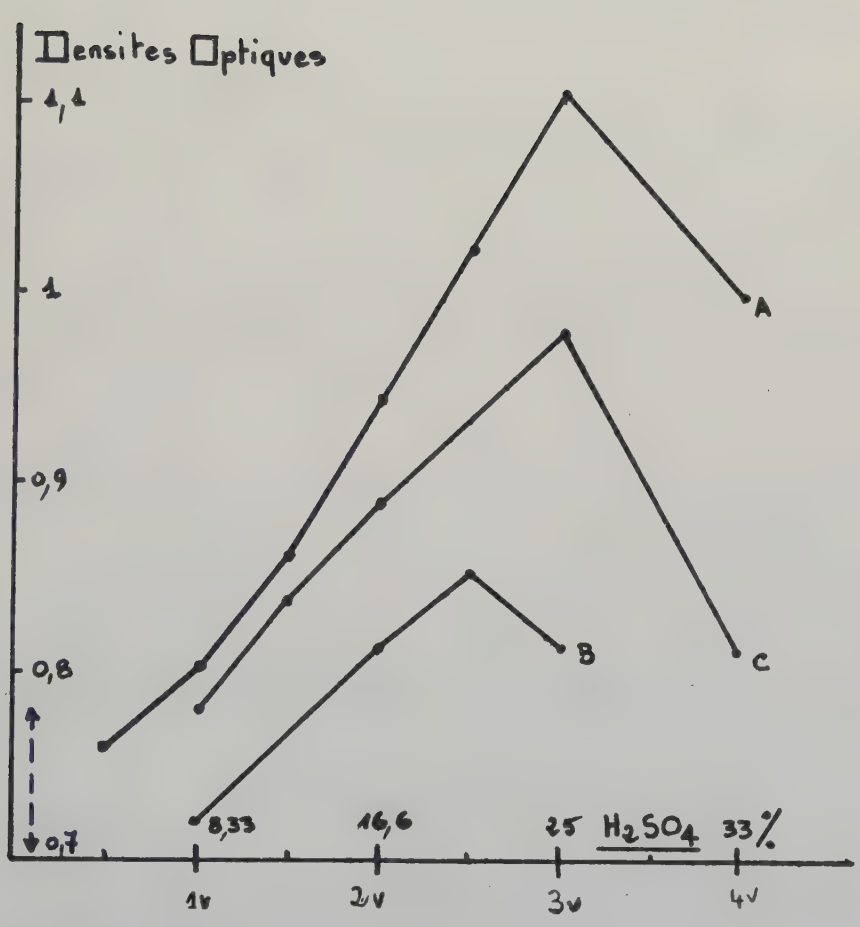


FIGURE N° 22 : Cinétique en fonction de la concentration en acide sulfurique. (mélange C).



IGURE N° 23 : Sensibilité en fonction de la concentration en acide sulfurique dans les mélanges A, B, et C.

Ces expériences démontrent l'importance de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique sur le développement de la réaction de Liebermann Burchard, tant sur le plan cinétique que sur le plan de la sensibilité. L'acide acétique joue uniquement le rôle de solvant de réaction.

- sur le plan spectral :

Il est possible de passer d'une réaction de Liebermann-Burchard à une réaction de Salkowski et même de visualiser simultanément les pics correspondant aux cations triényliques (λ max = 485 nm), tétraényliques (λ max = 550nm) et pentaényliques (λ max = 615 nm).

Pour le mélange classiquement utilisé comportant deux volumes d'acide sulfurique, une concentration en anhydride acétique égale à 13 % est la concentration minimale nécessaire au développement de la réaction de Liebermann-Burchard.

- sur le plan cinétique :

Dans ce même mélange on obtient une stabilité plus grande de la coloration en diminuant les concentrations en anhydride acétique (voir figure n°18).
Ceci pourrait être mis à profit dans les méthodes extractives : le mélange n°9, comportant seulement 40 % d'anhydride acétique, conduit à un plateau de stabilité de 15 minutes sans provoquer une perte importante de sensibilité par rapport au mélange classique (55 % anhydride acétique) (voir figure n°18).

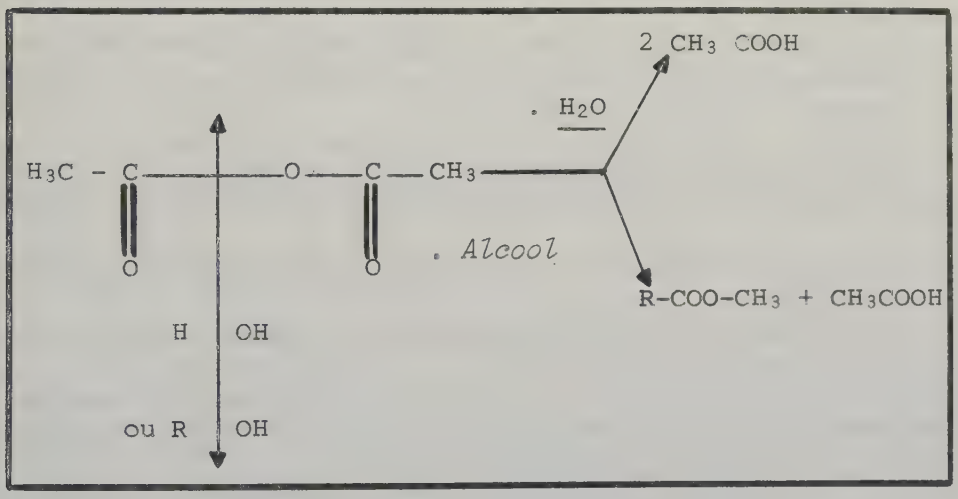
- sur le plan de la sensibilité :

Quelle que soit la concentration en anhydride acétique, la sensibilité maxima est obtenue pour des mélanges réactionnels comportant une quantité d'acide sulfurique comprise entre 2,5 et 3 volumes. Cette proportion d'acide sulfurique réalise des conditions optima à la fois de cinétique et de stabilité réactionnelles.

- *EAU ET ALCOOLS.*

Le comportement de ces solvants dans la réaction de Liebermann-Burchard est tout à fait particulier. L'ensemble des résultats obtenus s'explique par le rôle actif que joue le groupement OH de ces solvants vis à vis de l'anhydride acétique présent dans le mélange réactionnel : *hydrolyse* dans le cas de l'eau, *alcoolyse* dans le cas des alcools.

Nous avons schématisé cette réaction de la façon suivante :



Il en résulte une consommation en anhydride acétique d'où une quantité plus faible disponible pour le développement de la réaction de Liebermann-Burchard proprement dite.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent (tableau n°6) que le mélange n°12 comportant 1,3 volume d'anhydride acétique était le dernier développant encore une réaction de Liebermann Burchard. Il existe donc une masse limite d'anhydride acétique nécessaire au développement d'une réaction de Liebermann-Burchard (coloration bleue). Cette masse calculée pour 4 ml de mélange réactionnel est de 0,468 g.
A partir de cette valeur calculée nous essaierons d'expliquer les résultats obtenus tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

- *Sur le plan qualitatif.*

. *Volume limite.* En effet, il est possible de calculer, compte tenu du poids moléculaire et de la densité du produit considéré, le volume théorique de solvant développant une réaction de Liebermann-Burchard.

- dans 4 ml de mélange réactionnel nous avons une masse d'anhydride acétique de 1,979 g.
- pour atteindre la limite de développement de la réaction (masse restante d'anhydride acétique = 0,468 g), il faut donc qu'il y ait consommation de 1,979 - 0,468g= 1,511 g.
  Le volume théorique conduisant à cette consommation pour chaque solvant est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\frac{1{,}511 \times \text{poids moléculaire du solvant}}{\text{poids moléculaire de l'anhydride acétique} \times \text{densité du solvant}}$$

Le poids moléculaire de l'anhydride acétique est de 102g.

Les chiffres obtenus pour ces volumes limites sont rapportés dans le tableau n°8.
Parallèlement, nous avons porté dans ce tableau les valeurs trouvées pour les volumes limites expérimentaux et nous avons calculé le rendement correspondant.

Ces résultats appellent les commentaires suivants:

+ *Le rendement de la consommation* en anhydride acétique est à peu près identique pour tous les alcools, à l'exception du cas particulier des alcools tertiaires.
Les chiffres trouvés oscillent entre 88,5 et 100 %. Le rendement moyen est égal à 95 % aussi bien pour les mono-alcools primaires et secondaires que pour les polyols de même classe.
Les trois alcools cycliques et l'éther alcool étudiés conduisent à des résultats du même ordre.

+ *Seuls les alcools tertiaires* présentent un comportement nettement différent. Le rendement apparent est en effet supérieur à 100 %. Cette impossibilité nécessite la mise en œuvre d'un mécanisme réactionnel particulier à ces dérivés. On peut envisager en effet que dans un premier temps

il y a une déshydratation de l'alcool tertiaire (propriété bien connue) et consommation de l'anhydride acétique correspondant à la production d'eau par cette voie. Parallèlement on peut envisager une réaction d'addition complémentaire de l'anhydride acétique sur l'éthylénique formé expliquant ainsi le rendement apparent anormalement élevé.

. *Cinétique.*

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la teneur en anhydride acétique du mélange réactionnel (voir figure n°18). Par ailleurs, nous venons d'indiquer que l'adjonction d'un solvant hydroxylé s'accompagne d'une consommation correspondante d'anhydride acétique. Il faut toutefois remarquer que la réaction du dérivé hydroxylé sur l'anhydride acétique est nettement exothermique. Il en résulte donc sur le plan cinétique que l'augmentation du volume de solvant utilisé conduit à deux effets opposés à savoir :

- un ralentissement de la vitesse de réaction par consommation d'anhydride acétique.
- une accélération au contraire de la vitesse de réaction par effet thermique.

Les résultats expérimentaux permettent de préciser que l'effet thermique est dominé par l'effet de consommation en anhydride acétique puisque la vitesse de réaction diminue lorsqu'on augmente la quantité de solvant hydroxylé (voir figure n°10). Cet effet global sur la cinétique est d'autant plus net que la masse moléculaire du solvant considéré est plus importante. On peut même ajouter qu'à la limite dans le cas particulier de l'eau, l'effet thermique est prédominant.

- *Sur le plan quantitatif.*

Pour un volume identique de solvant ajouté, nous avions constaté une diminution de l'intensité de la coloration inversement proportionnelle au nombre d'atomes de carbone. Cette diminution de sensibilité n'est en fait qu'apparente. En effet pour un volume donné de solvant, la consommation en anhydride acétique est différente (voir tableau n°9).

TABLEAU N° 8 - Volumes limites théoriques (ml) de l'eau et des alco
Rendement de la réaction.

	Poids molécu - laire	*Densité*	*Volume limite théorique*	*Volume limite expéri- mental*	*Rendeme* $\frac{VLT}{VLE} \times 1$
EAU	*18*	*1*	*0,2666*	*0,28*	*95,2*
ALCOOLS ALIPHATI- QUES					
MONO-ALCOOLS					
C_1	32		0,585	0,65	90
C_2	46		0,841	0,84	100
C_3	60	0,81	1,11	1,18	94
C_4	74		1,363	1,54	88,
C_5	88		1,60	1,74	91,
C_6	102		1,84	2,02	91
C_7	116	0,82	2,137	2,30	92,
C_8	130		2,39	2,54	95,5
C_9	144		2,621	2,84	92,2
C_{10}	158	0,83	2,88	3,10	92,9
C_{11}	172		3,13	3,30	94,8
C_{12}	186		3,39	3,64	93,

	Poids moléculaire	*Densité*	*Volume limite théorique*	*Volume limite expérimental*	*Rendement* $\frac{VLT}{VLE} \times 100$
ALCOOLS III					
C_4	74	0,77	1,423	0,72	197,7
C_5	88	0,82	1,62	0,82	197,5
DIOLS et TRIOLS					
C_2	62	1,11	0,83 0,415	0,42	98,8
C_3 diol	76	1,05	1,07 0,535	0,56	98,8
C_3 triol	92	1,26	1,08 0,36	0,40	90
C_4 1-4,1-3	90	1	0,133 0,665	0,68	97,8
C_5 1-5	104	0,99	1,55 0,775	0,85	91,1
C_6 (méthyl 2 pentane diol 2-4)	118	0,92	1,894 0,947	0,88	107,6
ALCOOLS CYCLIQUES					
Cyclopentanol C_5	86	0,95	1,35	1,38	97,8
Cyclohexanol C_6	100	0,94	1,575	1,70	92,6
Alcool benzylique C_7	106	1,05	1,495	1,50	99,6
ETHER-ALCOOL					
Ether-alcool monométhylique C_3	76	0,96	1,77	1,24	94,9

Il en résulte une grande variation dans la concentration finale en anhydride acétique du mélange réactionnel. Or comme nous l'avons déjà vu dans l'étude de la sensibilité en fonction de la teneur en anhydride acétique (voir figure n°19), l'intensité de la coloration varie en fonction de cette concentration.

Après avoir calculé les proportions en anhydride acétique obtenues avec des volumes fixes des différents alcools, on peut corriger les D.O. observées dans chaque cas en prenant comme référence le terme en C_{10}.
Cette correction est calculée à partir de la courbe de sensibilité en fonction de la teneur en anhydride acétique dans le cas du chloroforme (voir figure n°19). Elle permet d'annuler l'influence sur la sensibilité de la teneur variable en anhydride acétique dans les divers cas. Les résultats sont présentés dans le tableau n°9. On voit qu'après correction par les trois volumes étudiés, les densités optiques corrigées sont sensiblement égales à celles fournies par le terme en C_{10} pris comme référence. On peut donc considérer que la longueur de la chaîne n'intervient pas sur le plan de la sensibilité absolue. L'influence apparente n'est que l'effet indirecte d'une modification de la teneur en anhydride acétique du mélange réactionnel, modification qui est directement en relation avec le poids moléculaire de l'alcool considéré.

On peut tirer de ces résultats un certain nombre de conséquences pratiques :

1. Compte tenu des faibles volumes limites obtenus avec les trois premiers termes, il n'est pas possible d'utiliser ces solvants comme agents d'extraction pour le dosage du cholestérol total.
En effet en opérant sur une extraction de sérum au 1/20, un volume d'extrait de 1 ml par l'isopropanol serait insuffisant pour développer une réaction colorée quantifiable. En augmentant la teneur en anhydride acétique du mélange réactionnel, on peut améliorer très légèrement la sensibilité mais on augmente considérablement l'effet thermique de la réaction et on diminue la stabilité du mélange réactionnel.

TABLEAU N° 9 - Densités optiques corrigées en fonction de la variation de la concentration en anhydride acétique

Volume ajouté à 4 ml de milieu réactionnel		*Concentration finale en (%) Anhydride acétique*	*Densité Optique Exper*	*Facteur de Correction*	*Densité Optique Corrigée*
0,50 ml	C_2	32,40	0,95	1,114	1,069
	C_3	35,07	0,96	1,096	1,052
	C_4	39,57	1	1,068	1,068
	C_5	42,81	1,02	1,051	1,07
	C_6	47	1,03	1,02	1,05
	C_7	48,57	1,04	1,013	1,053
	C_8	49,74	1,04	1,005	1,045
	C_{10}	51,3	1,06		
1 ml	C_4	25,89	0,86	1,10	0,946
	C_5	31,47	0,88	1,078	0,948
	C_6	34,47	0,88	1,057	0,935
	C_7	37,74	0,90	1,035	0,9315
	C_8	40,08	0,94	1,019	0,957
	C_{10}	43,3	0,94		
1,50 ml	C_6	22,47	0,76	1,10	0,836
	C_7	24,94	0,78	1,084	0,846
	C_8	30,42	0,82	1,0376	0,85
	C_{10}	36,15	0,86		

2. Pour les alcools à condensation en carbone plus élevée et en particulier pour l'alcool en C_8, on peut envisager au contraire une application pratique.
Dans les conditions habituelles, l'utilisation de 2 ml d'extrait au 1/20ème conduit à une sensibilité satisfaisante.

B. AUTRES SOLVANTS.

- HYDROCARBURES AROMATIQUES.

Ces solvants, faiblement polaires, possèdent une efficacité identique à celle du chloroforme sur le plan de la sensibilité. Mais on ne peut pas les utiliser puisqu'ils ne sont pas miscibles en toute proportion avec le mélange réactionnel. Comme les solvants chlorés, le gradient de miscibilité est inversement proportionnel au nombre de substituants : benzène > toluène > xylène.

- ESTERS ET ETHER-OXYDES.

Ils sont miscibles avec le mélange réactionnel. Mais leur influence sur le développement de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD n'est pas nulle : l'intensité de la coloration obtenue est très inférieure à celle obtenue avec le chloroforme, compte tenu du taux de dilution apporté par le volume de solvant. La différence s'accentue lorsque le volume augmente, elle est très marquée pour l'éther éthylique.

- *L'ACETONE.*

L'acétone constitue un mauvais solvant pour cette réaction et conduit à des résultats très inférieurs à ceux fournis par le chloroforme.

- *LES ACETALS.*

Le comportement du méthylal dans le mélange de LIEBERMANN-BURCHARD est tout à fait remarquable :

a) Sur le plan spectral et cinétique,

on observe avec ce solvant les quatre étapes successives de la réaction de Liebermann-Burchard correspondant aux quatre maximum d'absorption situés respectivement à 390, 490, 550 et 615 nm.
Contrairement à tous les autres solvants étudiés, le méthylal accélère la vitesse de réaction, mais il en résulte une faible stabilité de la coloration obtenue.

b) Sur le plan de la sensibilité,

le méthylal s'individualise également. Il développe une coloration 1,5 fois plus intense que celle obtenue avec le chloroforme pour des volumes inférieurs à 0,50 ml. Il semble donc qu'en présence de ce solvant, la réaction de Liebermann-Burchard, c'est-à-dire la formation du cation pentaénylique, soit plus complète.

- Sur le plan pratique, parmi les différents solvants étudiés, les solvants chlorés (chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane) présentent d'indiscutables avantages sur les autres solvants.

- Ils ont en effet un comportement que l'on peut qualifier de "neutre" vis à vis de la réaction de Liebermann-Burchard puisque :

. d'une part ils ne modifient en rien le rapport anhydrique acétique/acide acétique dont nous avons vu qu'il était un élément important de la réaction,

. d'autre part ils ne provoquent aucune élévation de température ce qui conduit à une meilleure reproductibilité et à un contrôle plus efficace de la cinétique.

. enfin ils présentent une complète miscibilité avec le mélange réactionnel, ce qui autorise le maximum de sensibilité pour les méthodes extractives utilisant ce solvant.

--oOo--

CHAPITRE II

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES ACIDES ARYLSULFONIQUES

Nous avons été intrigué par le fait que la différence la plus fondamentale entre les protocoles techniques découlant de la réaction de Liebermann-Burchard semble être la présence ou l'absence d'un acide benzène sulfonique dans la mélange réactionnel.
C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris une étude comparative avec différents acides sulfoniques et en leur absence en vue de préciser l'influence éventuelle de ces dérivés sur cette réaction.

RAPPEL DES TECHNIQUES PROPOSEES.

Les techniques se différencient :

- Sur le plan qualitatif :

- par la nature de l'acide benzène sulfonique dont la structure est rapportée dans la figure n°24,
- par le protocole technique,

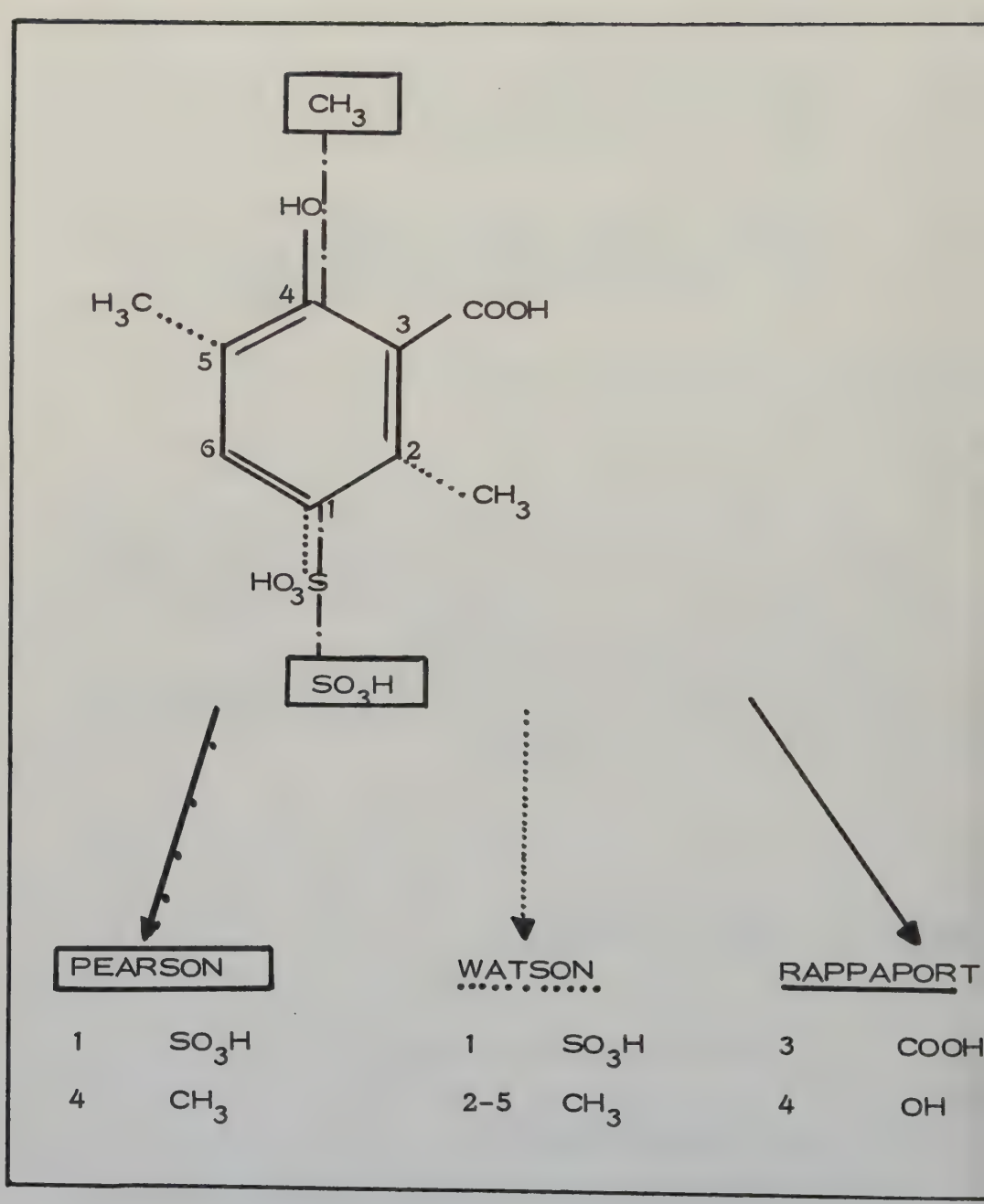


FIGURE N° 24 : Structure des acides benzènes sulfoniques.

TABLEAU N° 10 - Composition des différents mélanges réactionnels dans les protocoles utilisant un acide benzène sulfonique ou le sulfate de sodium (exprimée en % du volume final utilisé)

	P T S				D M B S		S S			
	PEARSON (118)	*LEPPAKEN (94)*	*WRIGHT (172)*	*JAMIESON(73) KALLNER (81)*	*WATSON (166)*	*RICHARDSON (126)*	*RAPPAPORT (123)*	*ZURKOWSKI (181)*	*HUANG (68)*	*FERRO-HAM (44)*
Sérum p.100 (Vf)	4,2	4,17	4,77	4,76	3,30	3,45	4,20	2	3,85	3,23
Acide acétique p.100 (Vf)	25	25	23,82	22,04	36,7	34,5	25	31,4	28,71	35,34
Anhydride acétique p.100 (Vf)	62,5	62,5	63,47	66,60	50	51,75	62,5	57,8	57,81	52,63
Acide sulfurique p. 100 (Vf)	8,30	8,33	7,94	6,60	10	10,30	8,3	8,8	9,63	8,80
ABS Molarité	0,147	0,12	0,19	0,138	0,045	0,052	0,161	0,05	0 (Na_2SO_4 0,14M)	0
Longueur d'onde de LECTURE (nm)	550	550	550	625	560 - 625	560	540	600	550 ou 610	640

- par la longueur d'onde de lecture choisie,
  . 550 nm dans la plupart des techniques et pour une raison assez inexplicable,
  . 620 nm.

- *Sur le plan quantitatif:*

Par les proportions respectives :

- *des différents constituants* du mélange réactionnel : acide sulfurique/acide acétique/anhydride acétique/acide benzène sulfonique.
- *de l'échantillon sérique* introduit dans le milieu réactionnel.

Le tableau 10 résume les caractéristiques des différentes techniques.

Cette étude réalisée antérieurement par R. CROCKETT (33) montre une identité presque totale dans le comportement du cholestérol et de quelques uns de ses esters physiologiques (stéarate, palmitate, oléate) lorsqu'on développe la réaction avec les divers acides benzène-sulfoniques ou en leur absence.
L'allure spectrale et la cinétique de la réaction sont pratiquement superposables. Seule, la sensibilité est différente. En effet, quelle que soit la méthode envisagée (FERRO, WATSON, RAPPAPORT, PEARSON) et à molarité identique, les esters conduisent à des absorptions supérieures à celles obtenues avec le cholestérol proprement dit.
Cependant, cette expérimentation, conduite sur des solutions pures en milieu chloroformique avec un protocole différent de celui habituellement pratiqué dans la méthode directe de FERRO, ne permet pas de conclure de façon décisive sur le comportement du cholestérol sérique.

Nous avons donc entrepris une étude de l'influence des acides benzène - sulfoniques selon un protocole directement applicable au sérum.

Une étude comparative ne pouvait être basée sur des protocoles aussi dissemblables que ceux énoncés antérieurement. Aussi, dans un but d'uniformisation, avons-nous établi un protocole expérimental comportant comme seule variable : le paramètre à étudier, c'est-à-dire la nature et

la teneur de l'acide benzène - sulfonique (ou du sulfate de sodium dans la méthode de HUANG).

MATERIEL ET METHODES.

MATERIEL.

1. PRODUITS CHIMIQUES.

- acide sulfurique Merck,
- acide acétique Merck,
- anhydride acétique Merck,
- acide paratoluène-sulfonique monohydraté Merck (PM = 190 g).
- acide sulfosalicylique Merck (PM = 254,22 g).
- acide diméthylbenzène sulfonique dihydraté Merck (PM = 200,27 g).
- sulfate de sodium anhydre Merck (PM = 142 g).

2. APPAREILLAGE.

Spectrophotomètre Philips Unicam SP 800.

UNIFORMISATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

L'uniformisation du protocole expérimental a été obtenue :

- *en préparant un mélange de base* (réactif n°1) qui renferme :

450 ml d'acide acétique,

550 ml d'anhydride acétique,

200 ml d'acide sulfurique.

A partir de ce réactif standard, il suffit d'ajouter l'acide benzène - sulfonique pour constituer les mélanges réactionnels propres à chacune des techniques.

- *en adoptant :*

- d'une part un rapport $\frac{\text{volume de sérum}}{\text{volume de mélange réactionnel}}$ correspondant à 0,20 ml pour 4 ml.
  La quantité de sérum ajouté est un facteur essentiel dans la réaction de Liebermann-Burchard. En effet, elle détermine le taux d'hydratation qui influence à la fois la cinétique et l'allure spectrale.
- d'autre part, un mode d'introduction du sérum parfaitement codifié (figure n°25) :
  - . on ajoute, à l'aide d'une micro-pipette et sans mélanger le sérum à la partie supérieure du mélange réactionnel.
  - . pour récupérer les dernières traces de sérum retenues par capillarité, on élève la pipette au-dessus du mélange, on applique la pointe contre la paroi du tube et on souffle en évitant toujours de mélanger.
  - . puis on agite vigoureusement pendant quinze secondes.

Ce mode opératoire présente l'avantage de réaliser au sein du mélange réactionnel un échauffement immédiat et uniforme, ce qui évite le développement d'une coloration jaune parasite. Il conditionne également la reproductibilité de la technique.

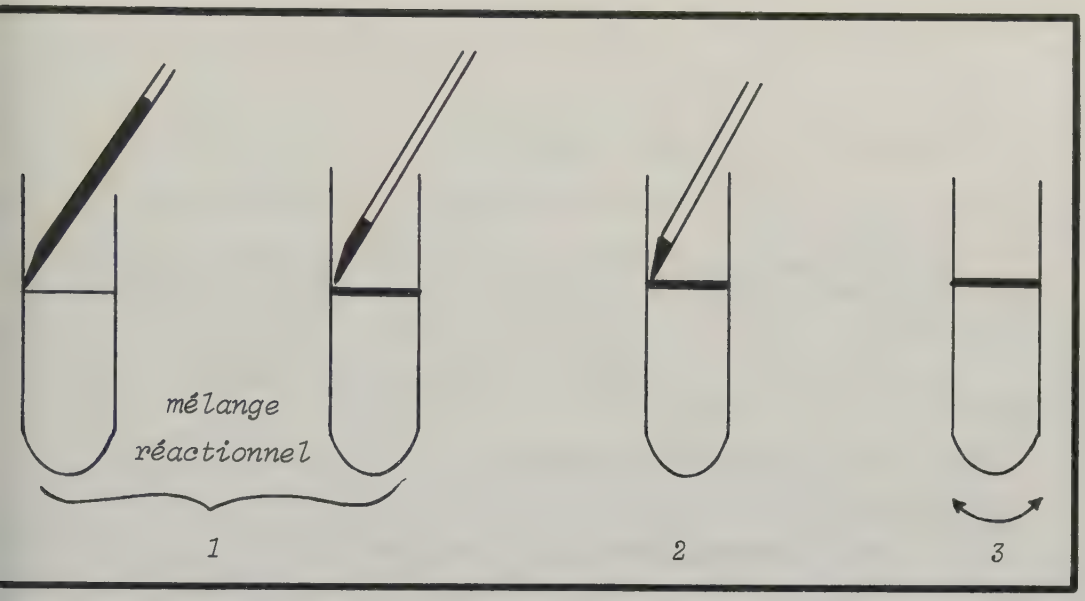


Figure n° 25 : Schéma du protocole opératoire utilisé.

ETUDE EXPERIMENTALE.

A partir de ce protocole, nous avons étudié l'influence des acides benzène - sulfoniques et du sulfate de sodium :

- sur le plan qualitatif, en fonction de la nature même de l'agent introduit,
- sur le plan quantitatif, en reconstituant des mélanges réactionnels à molarités différentes pour les divers acides et le sulfate de sodium.

En effet, pour chaque technique, nous avons préparé trois types de mélanges réactionnels I, II, III, correspondant à trois molarités que nous avons fixées respectivement à :

I	0,1875 M
II	0,125 M
III	0,0625 M

Pour les cinq techniques, nous avons abouti à une série de treize mélanges réactionnels numérotés de 1 à 13. (voir tableau n°11).

Notre étude a porté sur quinze sérums. Chaque échantillon a été testé :

- sur les 13 mélanges réactionnels,
- en double détermination.

Tous nos dosages ont été réalisés à 24°C.

RESULTATS.

Ces résultats peuvent être classés sous trois rubriques :

1. ETUDE SPECTRALE.

- Sur le plan qualitatif,

les résultats de cette étude sont présentés dans la figure n°26 pour la zone comprise entre 370 nm et 470 nm et dans la figure n°27 pour la zone comprise entre 550 et 650 nm.

En effet, si dans la réaction de Liebermann les lectures sont classiquement réalisées sur le pic correspondant à la coloration bleue (zone comprise entre 550 et 650 nm), certains auteurs (84, 104) utilisent le développement d'une coloration jaune correspondant à l'épaulement trouvé à 400 nm. Nous avons donc exploré ces deux zones spectrales.

TABLEAU N° 11 - LES DIFFERENTS MELANGES REACTIONNELS

1 - Réactif de FERRO	*Acide acétique*	MERCK	450 ml	
	Anhydride acétique	MERCK	550 ml	
	Acide sulfurique	MERCK	200 ml	
HUANG	*2* - Réactif de FERRO +	Na_2SO_4 anhydre	0,1875 M =	HUANGI
	3 - Réactif de FERRO +	" "	0,125 M =	HUANGII
	4 - Réactif de FERRO +	" "	0,0625 M +	HUANGIII
PEARSON	*5* - Réactif de FERRO +	Acide paratoluène-sulfonique	0,1875 M =	PTSI
	6 - Réactif de FERRO +	" "	0,125 M =	PTSII
	7 - Réactif de FERRO +	" "	0,0625 M =	PTSIII
RAPPAPORT	*8* - Réactif de FERRO +	Acide Sulfo-salicylique	0,1875 M =	SSI
	9 - Réactif de FERRO +	" "	0,125 M =	SSII
	10 - Réactif de FERRO +	" "	0,0625 M =	SSIII
WATSON	*11* - Réactif de FERRO +	Acide diméthyl benzène sulfonique	0,1875 M =	dMBS I
	12 - Réactif de FERRO +	" "	0,125 M =	dMBS II
	13 - Réactif de FERRO +	" "	0,0625 M =	dMBS III

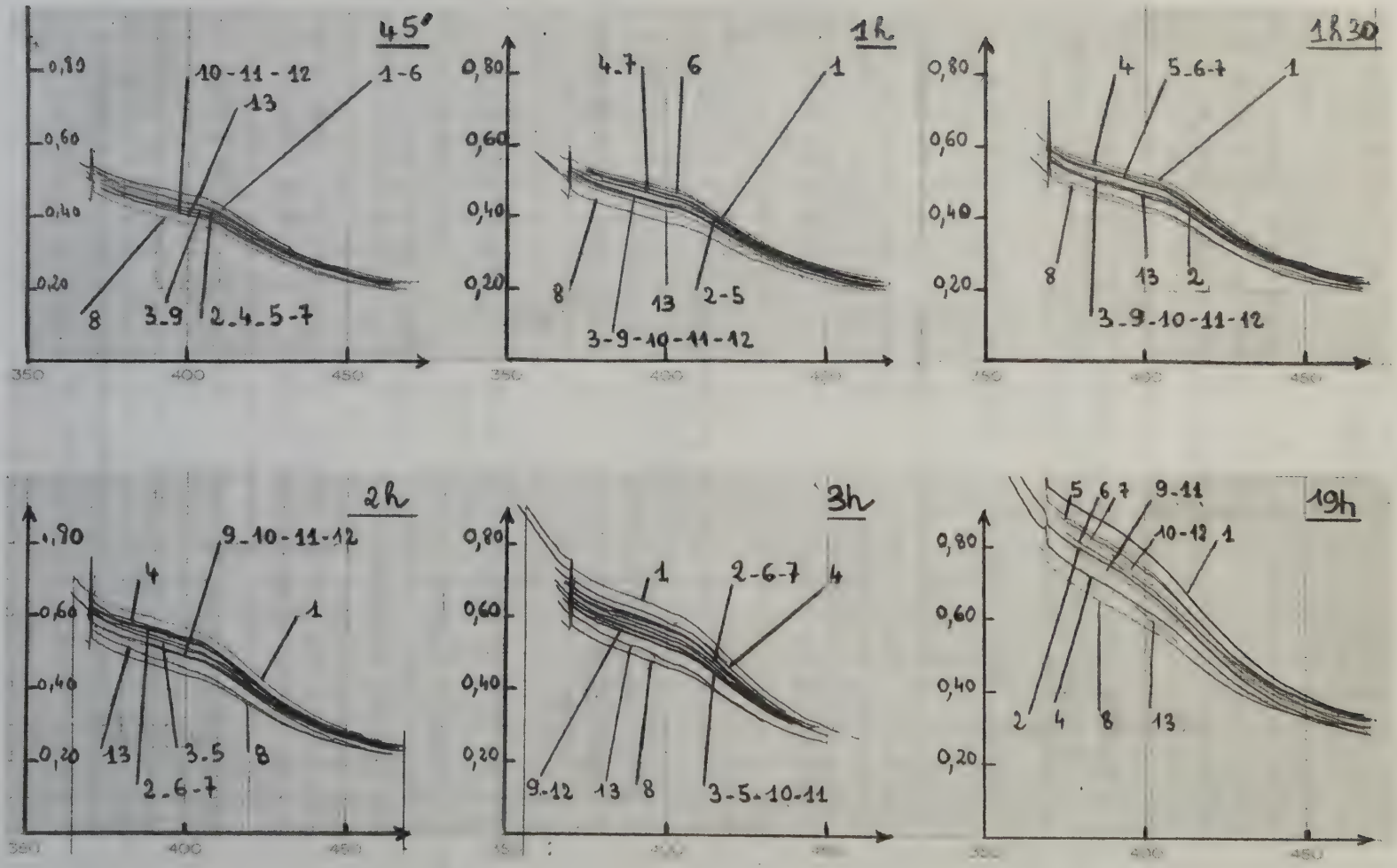


FIGURE N° 26 : Evolution spectrale en fonction du temps.(zone 350-450 nm).

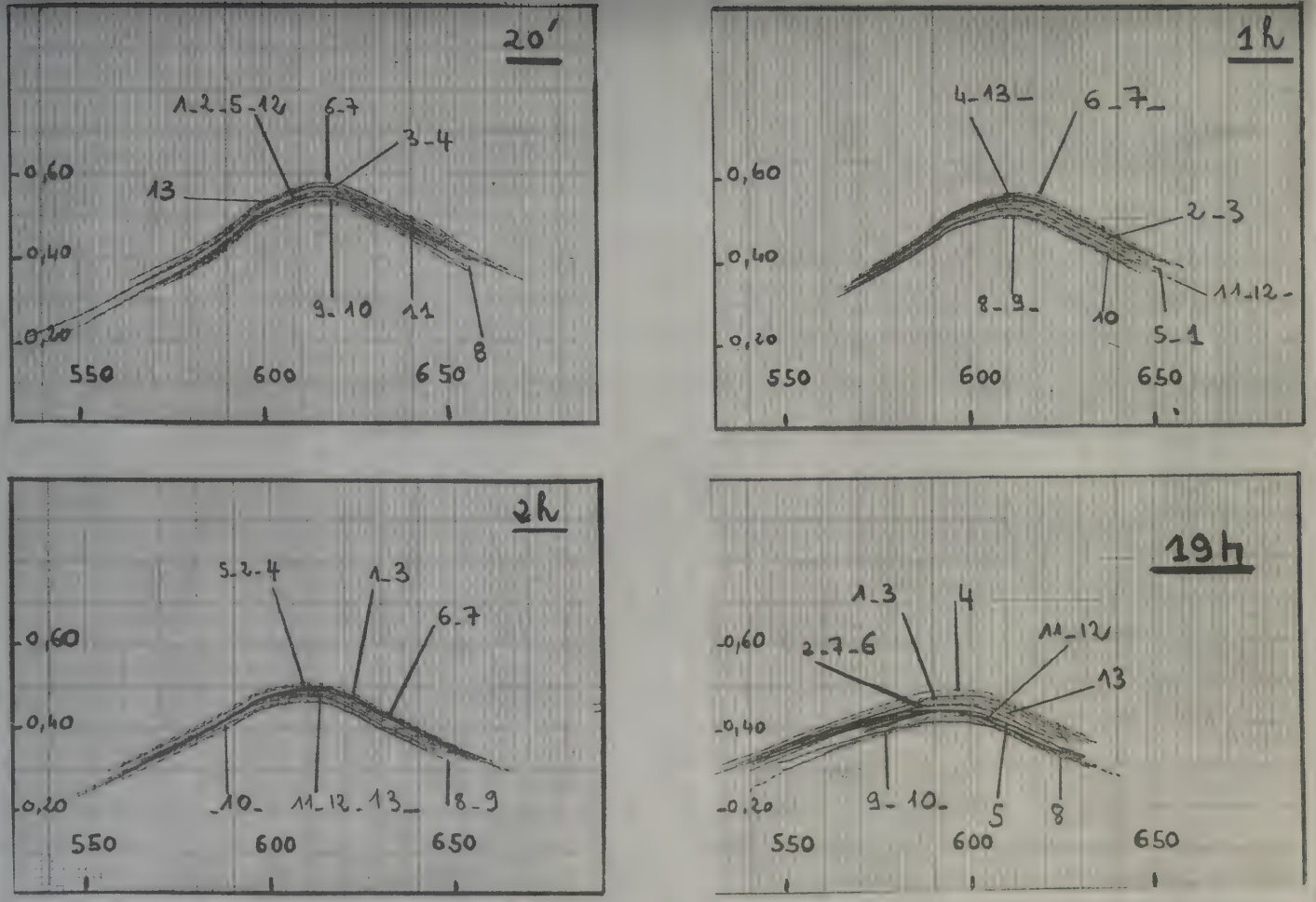


FIGURE N° 27 : Evolution spectrale en fonction du temps.(zone 550-675 nm).

Les figures n°26 et 27 montrent que tous les mélanges ont une allure spectrale identique caractérisée par les mêmes pics d'absorption dans le bleu et dans le jaune quelles que soient la nature et la concentration de l'adjuvant du mélange réactionnel.

- *Sur le plan quantitatif.*

L'acide benzène sulfonique (quelle que soit sa nature) comme le sulfate de sodium ne paraissent pas intervenir sur l'intensité de la coloration.
En effet, la sensibilité des différentes méthodes est dans l'ensemble pratiquement identique comme le montre le tableau n°12 où nous rapportons les densités optiques obtenues à 615 nm en cuve de 10 mm pour 10 sérums testés sur les cinq types de mélanges réactionnels 1 - 4 - 7 - 10 et 3.

On peut remarquer cependant que dans la plupart des cas, l'acide sulfosalicylique donne des résultats inférieurs de 3 à 5 % à ceux obtenus avec les autres acides sulfoniques.

La molarité des différents composés étudiés semble influencer, dans des limites très étroites mais assez nettes, la sensibilité de la réaction colorée. De manière quasi-constante, plus la concentration en acide benzènesulfonique ou en sulfate de sodium est élevée, moins la sensibilité est bonne. La molarité III apporte donc une sensibilité optimale comme le montre le tableau n°13 : il présente les densités optiques obtenues au bout de 10 minutes pour six sérums avec les treize mélanges réactionnels. Chaque chiffre représente la moyenne de deux déterminations.

2. ETUDE CINETIQUE.

Elle est illustrée et schématisée dans les figures n°28 et pour la longueur d'onde de 615 nm et dans les figures n°29 et pour la longueur d'onde de 400 nm.

TABLEAU N° 12 - Densité Optiques obtenues (exprimées en 1/100 de D.O.) en l'absence et en présence de sulfate de Sodium et des Acides Benzène Sulfoniques

	FERRO	*HUANG III*	*PEARSON PTS III*	*RAPPAPORT SS III*	*WATSON DMBS III*
1) MAY	33,5-34	33,5-32	32,5-32,5	30,5-30	31 -32
2) FRAN	41,5-41	41,5-43	40,5-41,5	37-38,5	40,5-43
3) LET	41 -39,5	42,5-41,5	45-46	40-41,5	42,5-41,5
4) LOB	51 - 49	49,5-51	51-50	48-48	49-49
5) NOU	67 - 68	66,5-66	70-70	63-64	64-65
6) VEL	39,5-40	38-39	39-40	38-38	40-40
7) PAS	22,50-24	23-24	22-23	21-22	21-22
8) MIC	33-33	32,5-33	32-32	31-32	32-33
9) BER	57-57,50	56-57	58-58	56-56	56-57
10) SOR	46-47,50	46-46	46-46	43,50-44	44-44

TABLEAU N° 13 - Densité Optiques obtenues (exprimées en 1/100 de D.O.) en fonction de la concentration en sulfate de Sodium et en Acides Benzène Sulfoniques

		1 - LAS	*2 - VER*	*3 - MON*	*4 - GIR*	*5 - DEL*	*6 - LAG*
FERRO		36	41,50	39,50	56	34	41
HUANG	I	35,5	40,75	39	56	33	40
	II	36,5	42	39	57	33,50	40,50
	III	37	43	40,50	58	35	42
PTS	I	38,5	44	39,50	57	35	41,50
	II	39	44,50	40	58	36	43
	III	39,50	44,50	41	58	36,50	43
SS	I	35,50	38,50	35,50	53	30,50	37,50
	II	36	40	37,50	53,50	31,50	38
	III	37	41	38	55	33	39,50
DMBS	I	36	40	36	55,50	34	41
	II	37	41,50	38	56	34,50	41,50
	III	38,50	43,50	41	58	35	42,50

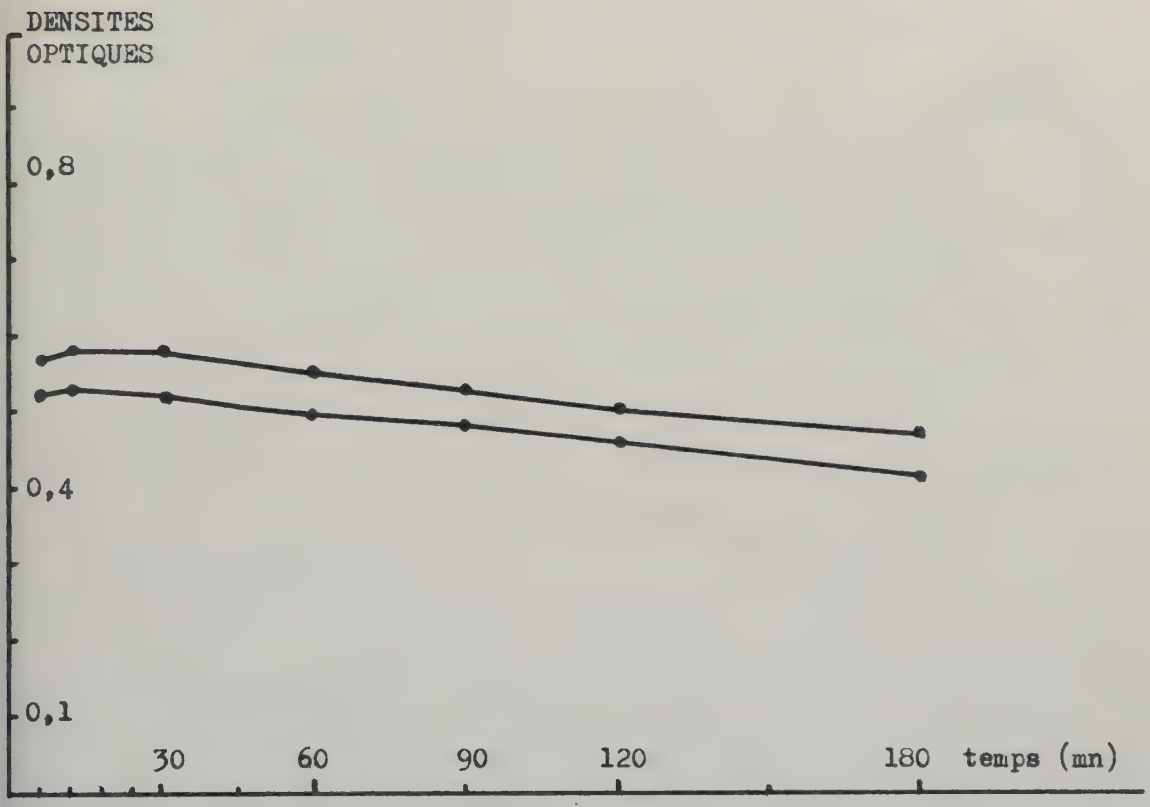


FIGURE N° 28 : Cinétique à 615 nm des différents mélanges réactionnels.

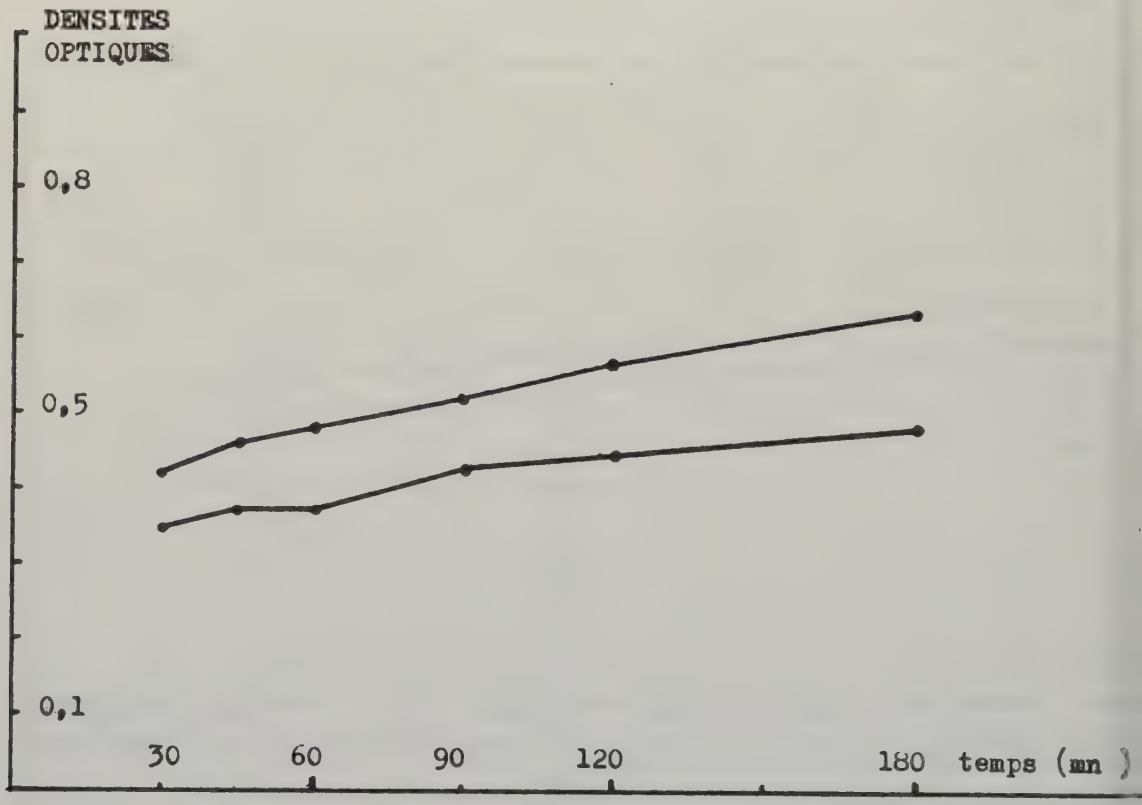


FIGURE N° 29 : Cinétique à 400 nm des différents mélanges réactionnels.

A chacune des deux longueurs d'onde considérées, la vitesse de développement de la réaction colorée évolue de manière parfaitement parallèle avec les 13 mélanges réactionnels étudiés.

- à 615 nm et à la température de 24°C, le maximum d'absorption est obtenu entre la 8ème et la 12ème minute. La réaction est stable pendant 5 minutes. Puis l'intensité de la coloration bleue diminue progressivement : par rapport au maximum d'absorption, on observe une diminution d'environ 10 % à la première heure et de 20 % à la deuxième heure pour l'ensemble des cinq méthodes. L'évolution de la coloration bleue initiale s'effectue lentement vers le vert puis le marron indépendamment de la nature et de la concentration de l'acide benzène - sulfonique et du sulfate de sodium, ce qui aboutit au bout de 19 heures à un décalage du spectre d'absorption avec un maximum à 590 nm.

- 400 nm, la cinétique est beaucoup plus lente qu'à 615 nm mais elle demeure identique pour les 13 mélanges réactionnels.

3. CONSERVATION DES REACTIFS.

Elle est envisagée sous deux aspects :

- d'une part, en étudiant à 400 nm le fond spectral de chaque mélange réactionnel conservé à + 4°C pendant une période de 4 mois.
- d'autre part, en testant la réactivité des différents mélanges concernés, sur une détermination sérique (tableau n°14).

DISCUSSION DES RESULTATS.

Le rôle des acides benzène-sulfoniques dans la réaction de Liebermann-Burchard, depuis le premier travail de PEARSON (118) en 1953, a fait l'objet d'interprétations diverses dont certaines apparaissent à l'évidence très fantaisistes. Il faut également souligner que dans la plupart des cas, ces interprétations théoriques ne sont étayées par aucun travail expérimental.

PEARSON ne donne aucune signification à l'introduction de l'acide paratoluène-sulfonique ; il se contente d'indiquer que, dans la méthode décrite, les esters du cholestérol présentent une chromogénicité équivalente à celle du cholestérol sous sa forme alcoolique. Cette affirmation nous semble éminament critiquable car elle est seulement basée sur la comparaison entre l'absorption du cholestérol et celle de l'acétate de cholestéryle. Or, il est bien connu à l'heure actuelle que les stérides du plasma sont essentiellement des dérivés des acides gras à longue chaîne en majorité mono ou poly non saturés,(linoléate, oléate, arachidonate)(57, 98, 142) qui sont susceptibles de présenter vis à vis de la réaction de Liebermann Burchard un comportement fort différent de celui de l'acétate.

LEPPANEN (94) ne donne pas plus d'explication. Il souligne la 'nécessité" de l'acide paratoluène sulfonique sans en préciser le rôle.

DUMAZERT (42) évoque la formation très problématique de paratoluène-sulfonate de cholestéryle. Ce composé jouerait le rôle de tampon vis à vis de l'acide sulfurique et il en résulterait une stabilisation de la réaction.

L'introduction d'autres acides benzène-sulfoniques à la place de l'acide paratoluène-sulfonique est consécutive aux risques d'explosion, selon JONES et MORELAND (74), du mélange d'anhydride acétique avec l'acide paratoluène-sulfonique. Par ailleurs, RAPPAPORT (123) attribue à l'acide sulfosalicylique un rôle d'agent dénaturant des lipoprotéines conduisant à la libération des lipides élémentaires, en particulier du cholestérol.

La seule explication valable paraît être la suivante :

La réaction de Liebermann-Burchard ne peut se développer qu'en milieu anhydre.
L'anhydride acétique du mélange réactionnel est susceptible d'éliminer l'eau apportée par le sérum en conduisant à de l'acide acétique. Cependant cette réaction d'hydratation est relativement lente à la température ambiante en l'absence de protons. Elle est par contre fortement accélérée par l'introduction de traces d'acide sulfurique ou d'acide benzène-sulfonique. On constate en effet que l'addition de sérum à de l'anhydride acétique seul ne provoque aucune élévation de température, tandis que en présence de traces d'acide sulfurique ou d'acide benzène-sulfonique, on obtient un échauffement grossièrement proportionnel à la quantité d'eau introduit. Les risques d'explosion décrits par JONES et MORELAND avec l'acide paratoluène-sulfonique sont probablement dus à des erreurs de mesure dans la quantité de sérum ajouté. Ce rôle de catalyseur protonique est schématisé dans la figure n°30.

Il n'est donc pas étonnant que les divers mélanges réactionnels testés dans ce travail aient conduit à des cinétiques et à des spectres d'absorption dont les caractéristiques sont pratiquement identiques.

Sur le plan de la conservation des divers réactifs, la mesure de la densité optique à 615 nm après quatre mois de conservation a +4°C conduit à des résultats tout à fait similaires. Tout au plus avons nous constaté une légère diminution de réactivité par rapport aux mélanges contenant le sulfate de sodium : cette baisse de réactivité est d'autant plus marquée que la concentration en acide benzène-sulfonique est plus grande. Par contre, aux erreurs d'expérience près, elle est sensiblement équivalente avec les trois acides benzène-sulfoniques. Ces résultats sont consignés dans le tableau n°14 présentant les densités optiques de la réaction lue à 615 nm en cuve de 20 mm obtenues en testant un même sérum sur les différents mélanges réactionnels conservés.

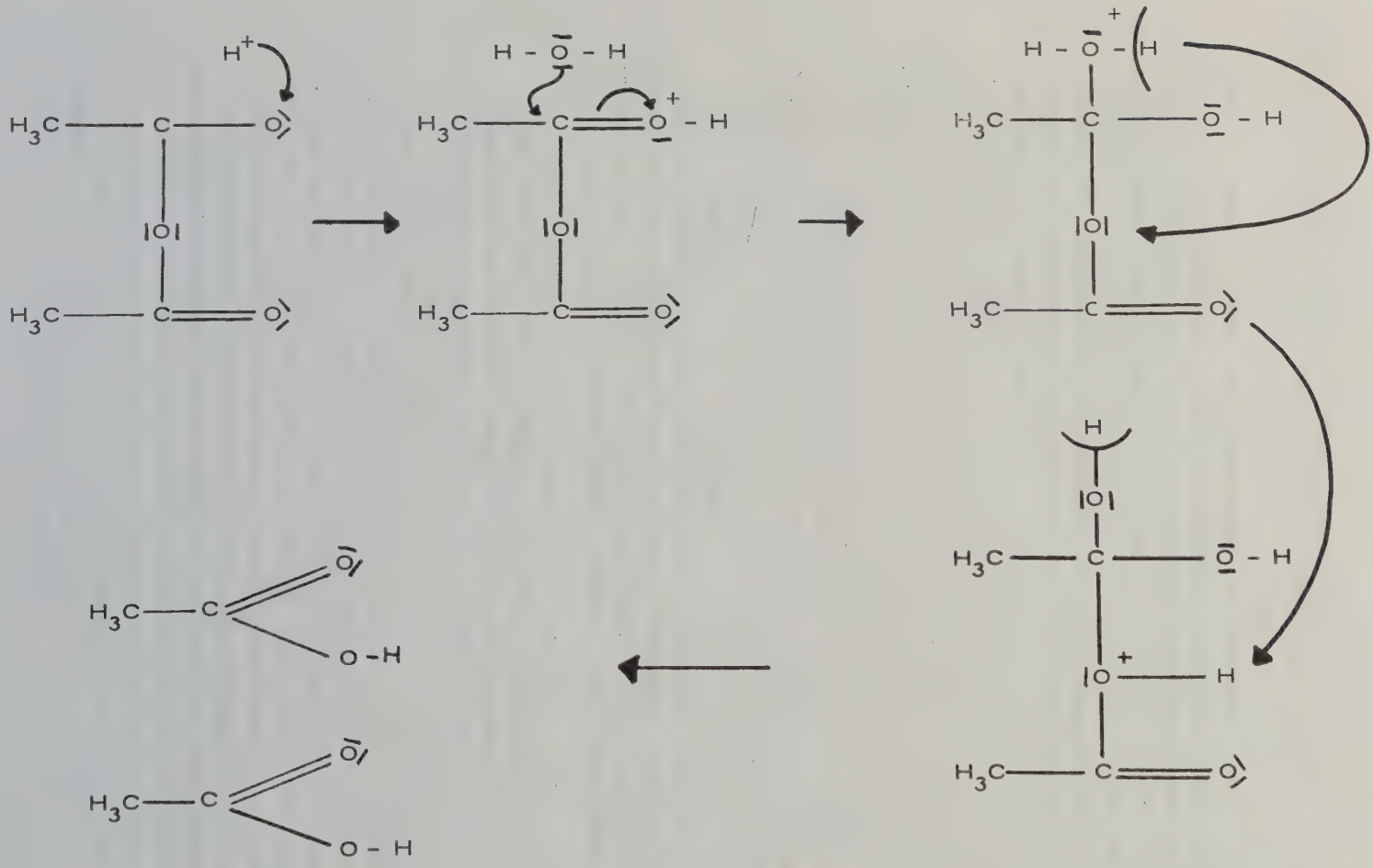


FIGURE N° 30 : Mécanisme de catalyse acide dans l'hydrolyse de

Tableau n° 14 : Densités optiques obtenues avec les mélanges réactionnels conservés.

Molarités	HUANG ($Na_2 SO_4$)	FERRO	PEARSON PTS	RAPPAPORT SS	WATSON DMBS
I 0,1875 M	0,98	0,86	0,74	0,80	0,75
II 0,125 M	1		0,76	0,82	0,78
III 0,0625 M	1		0,88	0,86	0,86

A l'issue de cette discussion, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1. Les réactions de PEARSON, RAPPAPORT, WATSON, FERRO et HUANG sont une seule et même réaction que seul différencie le protocole d'utilisation.

2. Notre étude démontre qu'il n'y a pas lieu de maintenir les appellations encore classiques actuellement de :

- méthode à l'acide toluène-sulfonique,
- méthode à l'acide diméthyl benzène sulfonique,
- méthode à l'acide sulfosalicylique.

En effet, ces dérivés ne modifient en rien, non seulement les taux de cholestérol obtenus, mais encore les densités optiques observées lorsqu'on se place dans des conditions expérimentales identiques. En conséquence, il y a lieu d'abandonner l'utilisation de ces acides benzène-sulfoniques et de ne retenir, comme méthode directe reposant sur la réaction de Liebermann-Burchard, que le seul protocole utilisant un mélange entièrement constitué, additionné de sulfate de sodium (68).

--oOo--

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE
DE L'INFLUENCE DE LA BILIRUBINE
DANS LA RÉACTION DE LIEBERMANN-BURCHARD
UTILISÉE EN VOIE DIRECTE

La présence de bilirubine dans le sérum pose au biochimiste un certain nombre de problèmes analytiques plus ou moins difficiles à résoudre. Substance fortement colorée, la bilirubine absorbe la lumière dans un domaine spectral allant du proche ultra-violet jusqu'à plus de 550 nm. Le spectre d'absorption s'étend même au-delà de 700 nm lorsque la bilirubine est transformée en biliverdine sous l'influence de réactifs acides et/ou oxydants (51). On comprend donc que ce pigment et ses produits d'oxydation soient susceptibles de perturber les mesures photométriques pratiquées *directement* sur le sérum : c'est ce que l'on observe en particulier dans les déterminations du cholestérol sérique et des phosphatases alcalines, pour des raisons différentes d'ailleurs (51).

Le mélange réactionnel très acide de Liebermann-Burchard oxyde la bilirubine en biliverdine qui absorbe à la même longueur d'onde que le produit coloré obtenu avec le cholestérol (λ max = 615 nm). Ainsi, le dosage en voie directe du cholestérol d'un sérum ictérique entraîne une surestimation de ce métabolite.

L'interprétation des résultats s'avère difficile non seulement sur le plan biochimique mais aussi sur le plan clinique : en pathologie hépatique par exemple une hypocholestérolémie sévère oriente le diagnostic et le pronostic des hépatites.

L'élimination de l'interférence due à la bilirubine est donc nécessaire. Elle a fait l'objet de divers travaux que nous rappellerons tout d'abord avant d'exposer notre contribution personnelle à l'étude de ce problème. Nous discuterons ensuite les résultats de notre expérimentation en essayant de dégager une solution présentant des garanties suffisantes de précision et de spécificité tout en conservant une valeur pratique (simplicité-rapidité) compatible avec son application en biologie clinique.

I. RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS.

Deux types de protocoles techniques d'inégale efficacité ont été préconisés.

1. LE PROTOCOLE EXTRACTIF.

Il nécessite une étape préalable qui réalise simultanément :

- l'extraction du cholestérol par un solvant organique, le plus souvent, le chloroforme (48), ou le mélange acétone-alcool (11), et,
- l'élimination de la bilirubine :
  - . par absorption sur une résine : le doucil (48),
  - . par coprécipitation avec les protéines (11).

On réalise dans une deuxième étape le dosage proprement dit sur l'extrait organique incolore.

Ce protocole élimine totalement la bilirubine.

2. LE PROTOCOLE DIRECT.

De nombreux artifices techniques visent à éliminer l'interférence due à la bilirubine tout en conservant la simplicité de la méthode directe.

On en distingue cinq principaux :

a) la réalisation d'un blanc,

b) le calcul d'une équivalence bilirubine-cholestérol : méthode par surcharge,

c) les méthodes en cinétique,

d) les méthodes par correction graphique,

e) la précipitation du cholestérol sans coprécipitation de la bilirubine.

a) LA REALISATION D'UN BLANC.

L'évaluation de la bilirubine est réalisée :

- *Directement :*

Le sérum est additionné d'acide acétique sans adjonction d'acide sulfurique (68, 118, 123).

La coloration obtenue est orangée. On effectue la lecture à 540 nm contre ce blanc. HOLMGARD (64) apporte une explication au choix de cette longueur d'onde : le spectre de la bilirubine dans le mélange de Liebermann-Burchard et dans le blanc présentent un point isosbestique situé à 540 nm. La loi de BEER est parfaitement suivie pour le cholestérol à cette longueur d'onde. La lecture à 540 nm devrait permettre d'éliminer l'interférence de la bilirubine. Mais, selon WATSON (166), ce point isosbestique varie en fonction des concentrations de cholestérol et de bilirubine et cette correction n'est pas valable.

- *Indirectement après réaction chimique.*

La bilirubine est oxydée en biliverdine tandis que le cholestérol ne réagit pas dans le mélange réactionnel choisi.

Divers agents d'oxydation ont été proposés :

. *L'acide sulfurique :*

NESS (112) propose un réactif constitué de 9 volumes d'acide acétique et $\frac{1}{1}$ volume d'acide sulfurique. Le comportement de la bilirubine est le même que dans le mélange de Liebermann mais cette correction par blanc n'est valable que pour des taux de bilirubine inférieur à 80mg/l.

Comme dans la technique précédente la forte proportion d'acide acétique entraine, presque toujours, la précipitation des protéines et la turbidité du milieu gêne la lecture. Pour l'éviter l'auteur suggère l'addition d'une petite quantité d'eau.

. *L'eau oxygénée :*

Le comportement de la bilirubine à 560 nm est identique dans le blanc et dans le mélange de Liebermann. Selon WATSON (166) cette correction par blanc est valable jusqu'à 280 mg/l de bilirubine. Mais, on rencontre souvent avec ce réactif des problèmes de turbidité dus à la présence d'acide acétique (126).

. *L'eau oxygénée en présence de peroxydase :*

RICHARDSON (126) remplace l'acide acétique par l'acide phosphorique et évite ainsi la précipitation des protéines.

. *La chloramine T (86) :*

C'est un bon agent d'oxydation mais le comportement spectral de la bilirubine dans ce mélange et dans le mélange de Liebermann-Burchard est sensiblement différent.

Dans toutes ces techniques, la densité optique du blanc est soustraite de la densité optique du dosage obtenue à 540 nm.

b) LE CALCUL D'UNE EQUIVALENCE BILIRUBINE-CHOLESTEROL : METHODE PAR SURCHARGE.

Ce procédé consiste à introduire artificiellement dans un sérum anictérique des quantités connues et croissantes de bilirubine.

On compare les taux de cholestérol obtenus avec le mélange de Liebermann par rapport au sérum témoin.

100 mg de bilirubine correspondent à :

- 0,36 g/l de cholestérol POSTMA (122),
- 0,45 g/l de cholestérol MOLINE (108),
- 0,47 g/l de cholestérol RUNDE (137), KIM (85),
- 0,50 g/l de cholestérol VAN BOETZELAER (161) et JAMIESON (73),

- 0,55 g/l de cholestérol CROCKETT (34),
- 0,60 g/l de cholestérol GIRARD (51).

L'extension aux sérums ictériques de ces données théoriques semble difficile. En effet pour GIRARD, la bilirubine "endogène" apporte une perturbation de 10 % supérieure à celle de la bilirubine "exogène" (100 mg de bilirubine = 0,77 g/l de cholestérol). Ceci laisse supposer un comportement différent de la bilirubine directe et de la bilirubine indirecte. Selon cet auteur, la bilirubine extractible, c'est-à-dire la bilirubine indirecte, non conjuguée, conduit à un surdosage supérieur au double de celui de la bilirubine totale (100 mg de bilirubine = 1,77 g/l de cholestérol) (51).

c) LES METHODES EN CINETIQUE.

HEWITT en 1973 (62), MANASTERKI et ZAK (102) en 1974, ont proposé une méthode de dosage du cholestérol en cinétique. Ces auteurs ont étudié les vitesses de réaction respectives du cholestérol et de la bilirubine dans la réaction de Liebermann-Burchard en fonction :

- de la composition du mélange réactionnel : une concentration importante en anhydride acétique diminue l'interférence apportée par la bilirubine, mais il en résulte une grande instabilité du réactif,
- de la température de réaction,
- de la concentration relative des deux paramètres,
- du temps de lecture fixé à l'issue de ces études à : λ max = 620 nm

  + 5 minutes pour ZAK,

  + 20 secondes pour HEWITT.

Si, sur le plan théorique (solutions pures de cholestérol et de bilirubine en milieu non aqueux) l'interférence de la bilirubine peut être minimisée, sur le plan pratique, la présence d'eau apportée par le sérum dans les méthodes directes ne permet plus de dissocier le comportement du cholestérol et de la bilirubine sériques.

d) LA METHODE PAR CORRECTION GRAPHIQUE.

SOMMERS (149) propose une méthode par lecture à deux longueurs d'onde. Son principe est le suivant : l'absorption de la bilirubine dans la réaction de Liebermann est identique à 618 nm et à 730 nm. La Δ D O (618 nm-730 nm) devient indépendante de la concentration en bilirubine et proportionnelle à la concentration de cholestérol jusqu'à une valeur égale à 4 g/l.

e) PRECIPITATION DU CHOLESTEROL SANS COPRECIPITATION DE LA BILIRUBINE (JORDAN (75)).

Les lipoprotéines donc le cholestérol sont précipitées par un mélange de sulfate de dextrane-chlorure de calcium. Après centrifugation, le surnageant contenant la bilirubine est éliminé, le culot est dissous dans du sérum physiologique. La réaction colorée est réalisée sur cette solution saline.

A l'exception de DREZGA et MIKAC-DEVIC (39) pour qui l'interférence due à la bilirubine est tout à fait minime dans la plupart des sérums ictériques, tous ces auteurs affirment le contraire.

Dans un excellent article ZAK (177) étudie le comportement spectral et cinétique du cholestérol et de la bilirubine dans la réaction de Liebermann-Burchard en fonction:

- de la température du mélange réactionnel,
- des concentrations de cholestérol et de bilirubine,
- de la quantité d'eau introduite par le sérum.

Cette étude montre qu'il est difficile de supprimer de manière efficace l'influence de la bilirubine dans cette méthode utilisée en voie directe.

En effet, les méthodes de correction proposées sont bien souvent non justifiées sur le plan théorique et leur application en pratique n'est souvent valable que pour des taux de bilirubine relativement faibles :

- *les méthodes utilisant un blanc* n'offrent aucune garantie d'exactitude, la similitude du comportement de la bilirubine dans le mélange de Liebermann et les divers mélanges réactionnels suggérés n'est pas toujours démontrée. Le choix de la longueur d'onde de lecture (λ = 540 nm) semble d'autre part assez étonnant.

- *les méthodes par surcharge* sont satisfaisantes sur le plan théorique. Elles sont malheureusement difficiles à appliquer au milieu complexe qu'est le sérum sanguin.

- *les méthodes en cinétique* apportent peu d'améliorations par rapport aux méthodes en point final.

Seul SOMMERS démontre expérimentalement la validité d'une correction graphique.

II. TRAVAIL PERSONNEL.

Nous avons essayé de réexaminer le problème analytique posé par la bilirubine. Nous l'avons abordé :

- *sur le plan théorique* par une étude sur une solution pure de bilirubine,
- *sur le plan pratique* par une étude sur des sérums ictériques.

Trois aspects ont retenu notre attention :

1.- la possibilité d'effectuer un blanc,

2.- la possibilité de chiffrer le surdosage apporté par la bilirubine,

3.- la validité d'une éventuelle correction graphique.

Cette étude est divisée en deux paragraphes :

I. Matériel et méthodes.

II. Travail expérimental.

I. MATERIEL ET METHODES.

a) MATERIEL.

1. Produits chimiques :

Ils sont tous de marque MERCK.

- solution chloroformique de cholestérol à 4 g/l.

Solutionsétalons :

- cholestérol :
  - . sérum étalon lyophylisé : SERACHOL* (lot n°2358125) titré à 4,20 g/l de cholestérol,
  - . solutions aqueuses de cholestérol PRECISET-BOEHRINGER.
- bilirubine :

  bilirubine DADE en solution albumineuse (55 g/l) titrée à 200 mg/l.
- zéolithe (= DOUCIL) utilisée dans la méthode extractive fournie par les laboratoires TOUZART et MATIGNON. Elle doit être activée pendant 4 h à 125°C.

2. Réactifs:

a) mélange de FERRO :

sa composition est la même que celle décrite dans l'étude des solvants.

b) Le blanc :

a la composition suivante :

- acide sulfurique : 2 volumes,
- acide acétique : 3 volumes.

* Laboratoire PRECIBIO.

L'acide sulfurique est ajouté très lentement dans l'acide acétique refroidi dans de la glace.

3. Appareillage :

- Unicam Philips SP 8000 pour les études spectrales (échelle 0 à 1 D. O. et échelle 0 à 0,20 D. O.).
- Autoanalyseur Technicon de première génération pour le dosage de la bilirubine.

b) Méthodes :

1. Dosage du cholestérol :

- *en voie directe :* il est réalisé selon le protocole décrit dans le chapitre précédent ;
- *en voie semi-extractive.*

Nous avons adopté le protocole de FORBES (48) modifié par CROCKETT (35).

Il comprend deux étapes :

a) L'extraction du cholestérol :

Dans un tube bouchant émeri, on introduit 2 g de Doucil et 1 ml de chloroforme. On agite pour imbiber de Doucil. Puis, on ajoute 0,50 ml de sérum. On agite à nouveau énergiquement pour bien fixer le sérum sur la résine. On ajoute enfin 9 ml de chloroforme. On agite vigoureusement et à plusieurs reprises pendant 10 minutes. L'extrait chloroformique est recueilli par filtration.

b) Le développement de la réaction colorée :

- On mélange 4 ml extrait chloroformique,
  4 ml de mélange de FERRO,
- On agite,
- On lit à 615 nm au bout de 20 minutes,
- Parallèlement et dans les mêmes conditions on effectue un étalonnage de 1,05 à 4,20 g/l de cholestérol.

2. Dosage de la bilirubine :

Ce dosage est basé sur la diazocopulation avec l'acide sulfanilique. Le dosage de la bilirubine totale est effectué selon le protocole de MICHAELSSON (107) en présence de diphylline qui joue le rôle d'accélérateur. Les azopigments obtenus sont colorés en rose, leur maximum d'absorption se situe à 550 nm.

Nous avons adapté cette technique en voie automatique (travail non publié). L'adjonction à des temps différents de Vitamine C, agent de blocage de la réaction, permet la détermination successive de :

- la bilirubine totale,
- la bilirubine directe,
- du blanc sérum. Ce dernier se révèle indispensable pour les sérums hémolysés et lactescents.

II. TRAVAIL EXPERIMENTAL.

Nous avons examiné le comportement spectral de la bilirubine et du cholestérol en solution pure dans le mélange de FERRO et dans divers mélanges réactionnels susceptibles d'être utilisés pour la réalisation d'un blanc.

1. ETUDE SPECTRALE THEORIQUE.

a) Comportement du cholestérol et de la bilirubine dans le mélange réactionnel de FERRO : correction graphique.

- Le cholestérol :

Nous rappellerons qu'avec le mélange de FERRO, le cholestérol donne une coloration bleue (λ max = 615 nm) dont le maximum de sensibilité est atteint suivant la concentration entre 15 et 20 minutes à la température ordinaire.

L'étude du spectre nous montre qu'à une longueur d'onde égale à 685 nm, l'absorption du cholestérol est égale à la moitié de l'absorption maxima à 615 nm (figure n°31). Nous l'avons vérifié d'une part, sur des solutions pures de cholestérol en solution chloroformique et de ses principaux esters physiologiques, d'autre part, sur une solution étalon sérique : le SERACHOL.

- *La bilirubine :*

. *L'aspect spectral :*

Le spectre développé par une solution concentrée de bilirubine dans le mélange de FERRO (figure n°32) présente :

- quatre maximums d'absorption :
  . 3 pics respectivement situés à 390, 450 et 520 nm,
  . une bande d'absorption de 600 à 700 nm.
- deux pointsisosbestiques situés à 420 et 550 nm.

Ce spectre évolue très rapidement en fonction du temps ce qui traduit l'oxydation progressive de la bilirubine en biliverdine. La coloration obtenue est verte. L'évolution spectrale ne peut être saisie nettement que pour des taux élevés de bilirubine. Celle-ci est schématisée dans la fig.32. Pour des concentrations moins importantes, seul le pic à 520 nm et la bande d'absorption de la biliverdine peuvent être visualisés.

. *L'aspect cinétique :*

- *à 520 nm :* la vitesse de disparition de ce pic est d'autant plus rapide que la concentration en bilirubine est faible (fig. n°33).
- à 615 et 685 nm : à partir de 100 mg/l, l'oxydation de la bilirubine est indépendante de la concentration, le maximum d'absorption est obtenu entre la 20ème et la 25ème minute (figure n°34).

. *L'aspect quantitatif : (figure n°35)*

On constate que :

- d'une part, à 615 nm la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée jusqu'à 400 mg/l,

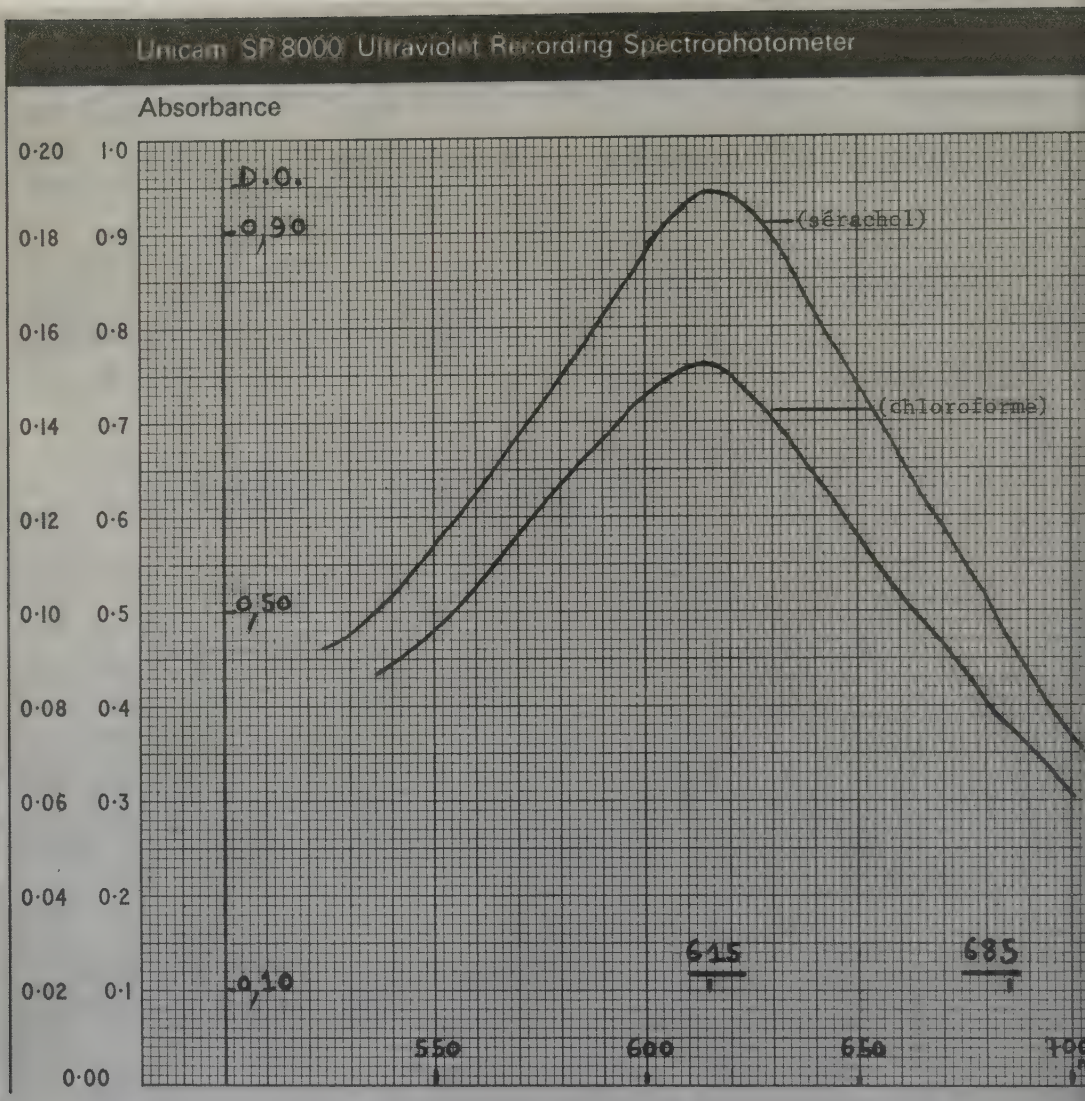


FIGURE N° 31 : Spectre du cholestérol dans le mélange de Ferro.

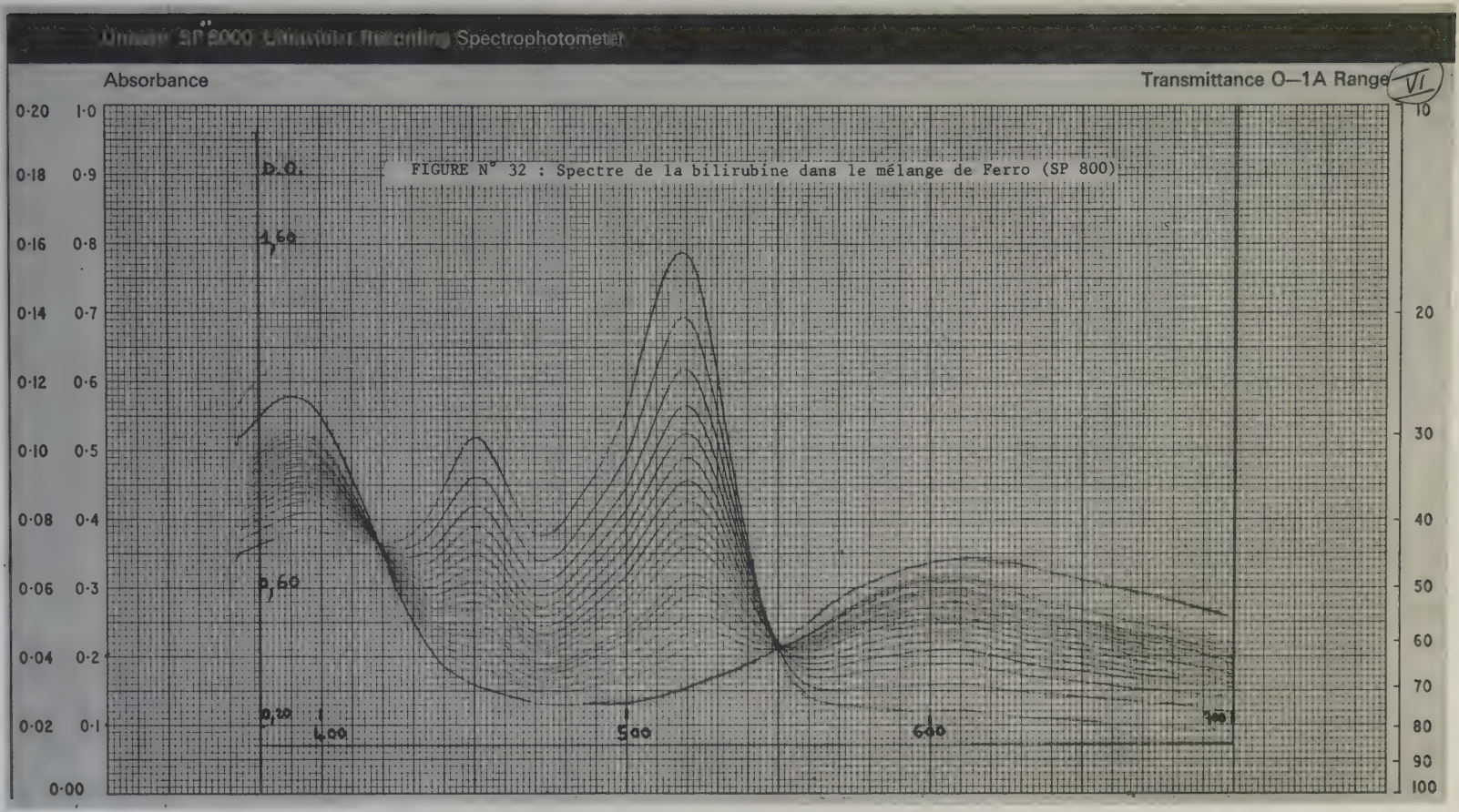


FIGURE N° 32 : Spectre de la bilirubine dans le mélange de Ferro (SP 800)

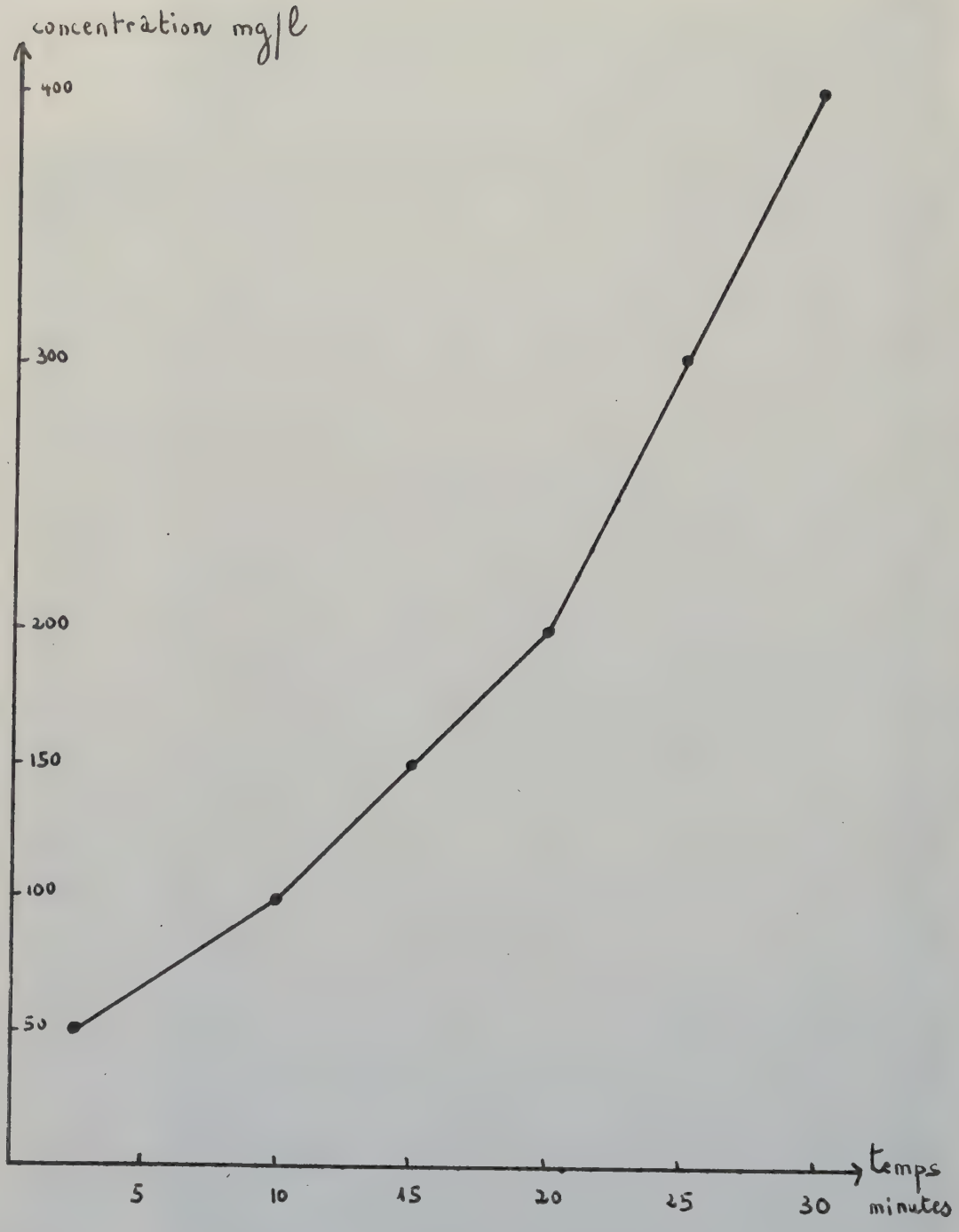
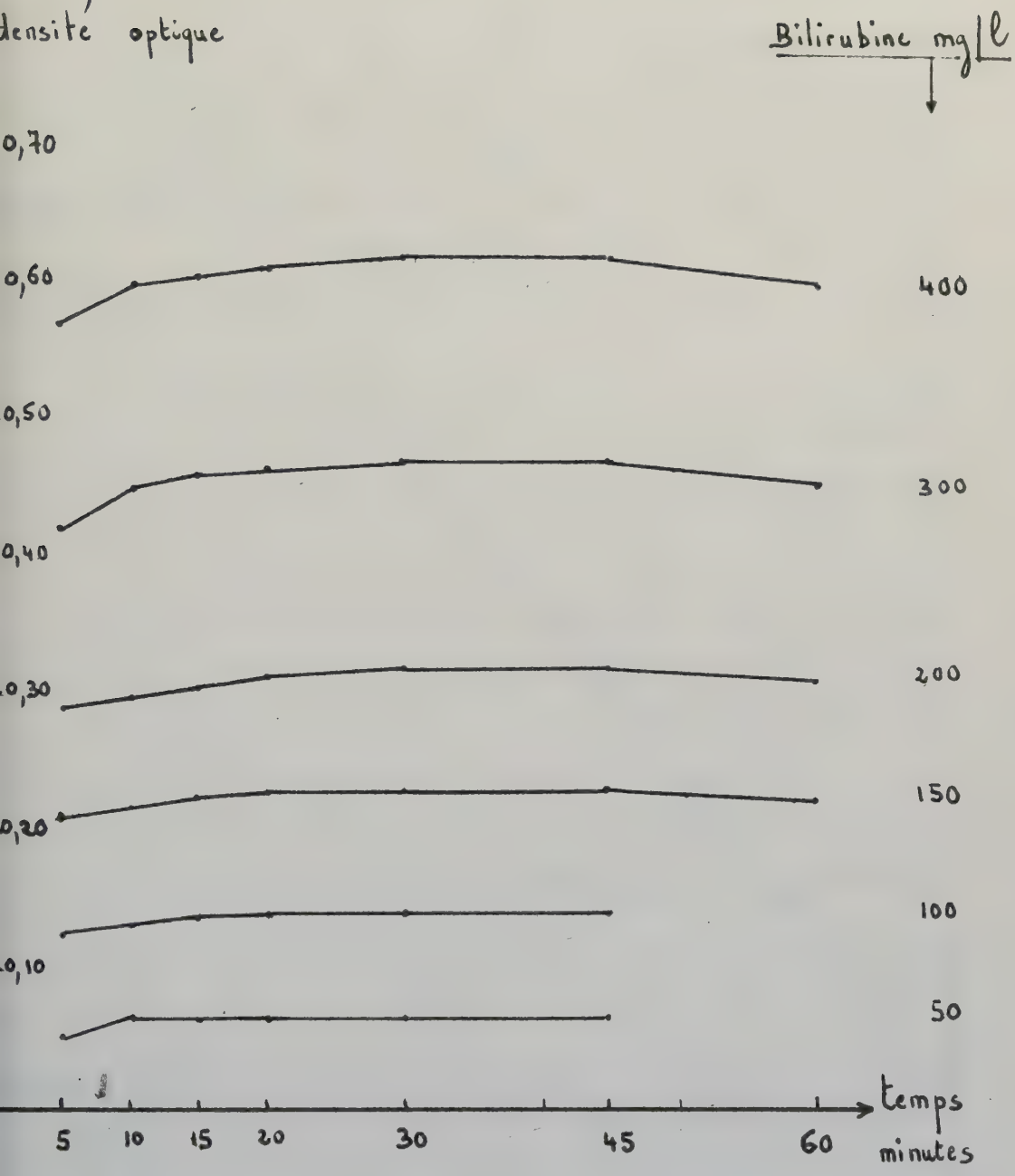


FIGURE N° 33 : Temps de disparition du pic à 520 nm en fonction de la concentration en bilirubine.



IGURE N° 34 : Cinétique de la bilirubine à 615 nm en fonction de sa concentration dans le mélange de Ferro.

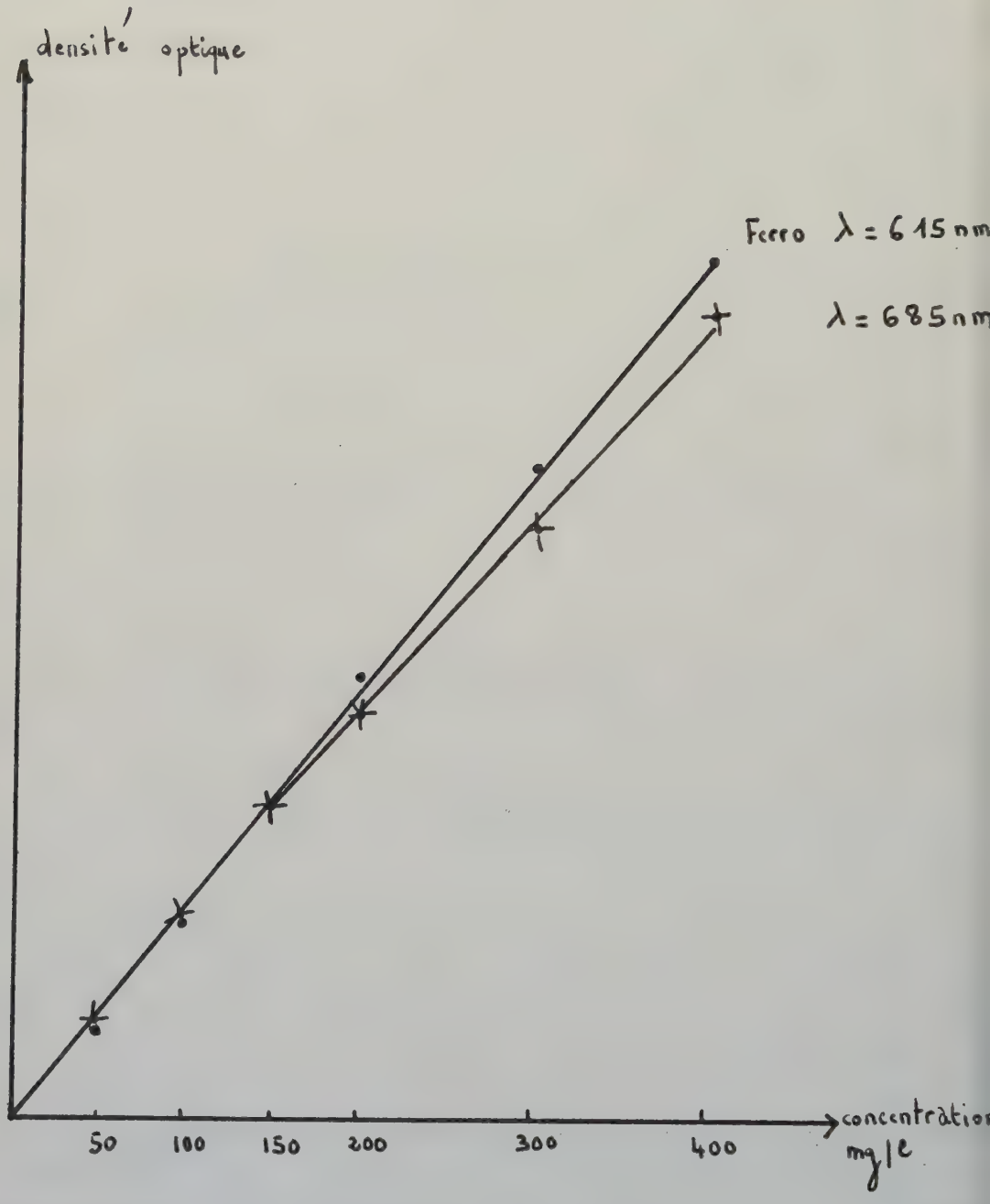


FIGURE N° 35 : Absorption de la bilirubine à 615 nm et à 685 nm en fonction de sa concentration dans le mélange de Ferro

- d'autre part, l'absorption de la bilirubine à 615 et 685 nm est identique pour des taux de bilirubine compris entre 50 et 150 mg/l. Au-delà de cette concentration, l'absorption à 685 nm devient légèrement inférieure à celle observée à 615 nm. Cependant, le rapport

$$\frac{\text{densité optique à 685 nm}}{\text{densité optique à 615 nm}}$$

est constant, il est égal à 0,90.

b) *Comportement du cholestérol et de la bilirubine dans divers mélanges réactionnels : correction par blanc.*

Nous nous sommes attachés à essayer de développer une réaction colorée due exclusivement à la bilirubine :

- soit en essayant de dissocier la cinétique de réaction de la bilirubine de celle du cholestérol par l'adjonction au mélange réactionnel classique d'ions ferriques.
- soit en modifiant les proportions relatives de l'anhydride acétique du mélange de FERRO initial de telle sorte que le cholestérol ne développe aucune réaction colorée,
- soit en cumulant l'effet cinétique et l'effet de blocage de la réaction colorée du cholestérol.

Quatre mélanges réactionnels, dont la composition est indiquée ci-dessous ont été utilisés :

Mélanges	*Acide sulfurique (volume)*	*Anhydride acétique (volume)*	*Acide acétique (volume)*	*Perchlorure de fer mg/l*
1	2	5,5	4,5	50
2	2	2	8	50
3	2	-	10	50
4	2	-	3	-

1. *Le mélange n°1* conduit aux résultats suivants :

- *sur le plan spectral :*

A 615 nm, le cholestérol se comporte comme dans le mélange de FERRO.

Pour la bilirubine, au contraire, le maximum d'absorption se situe vers 700 nm, les densités optiques à 615nm sont inférieures à celles obtenues à cette même longueur d'onde dans le mélange de FERRO.

- *sur le plan cinétique :*

La bilirubine est oxydée spontanément mais la réaction colorée développée par le cholestérol est également très accélérée.

Dans ces conditions, l'adjonction d'ions ferriques au mélange réactionnel classique n'est pas susceptible de conduire à une correction par blanc.

2. *Les mélanges 2 et 3* conduisent aux résultats suivants :

a) La bilirubine :

- *sur le plan spectral :* on retrouve le spectre d'absorption observé avec le mélange de FERRO ; on note en particulier que les densités optiques lues à 615 nm et 685nm sont identiques pour des concentrations inférieures à 200mg/l.

- *sur le plan cinétique :* de 50 à 300 mg/l,l'oxydation de la bilirubine est immédiate.

b) Le cholestérol :

On observe une coloration rose de très faible intensité dont le maximum d'absorption se situe à 540 nm. La cinétique de développement de cette coloration est très lente, plus particulièrement avec le mélange 2. L'absorption à 615 nm est négligeable pour des concentrations inférieures à 4 g/l jusqu'à la 10ème minute.

Il semble donc possible d'utiliser ces mélanges pour réaliser une correction par blanc.

3. Le mélange 4:

C'est un mélange binaire contenant une forte proportion d'acide sulfurique.

a) La bilirubine :

- sur le plan spectral : (figure 32bis)

Le spectre obtenu avec ce mélange réactionnel possède initialement quatre maximum d'absorption situés respectivement à 385, 450, 515 et 595 nm et deux points isosbestiques à 405 et 535 nm.

- sur le plan cinétique :

Il faut signaler qu'après agitation, la présence de bulles dues à la viscosité du milieu riche en acide sulfurique ne permet pas de réaliser de lecture spectrophotométrique avant 20 minutes.

D'une façon générale, la cinétique est beaucoup plus lente que dans le mélange de FERRO :

- *à 385, 450 et 515 nm :* pour des taux supérieurs à 100 mg/l, le pic à 515 nm a disparu au bout d'une heure tandis que persistent le pic à 385 nm et une ébauche à 450 nm.
- *à 595 nm :* la vitesse d'oxydation de la bilirubine est fonction de la concentration. La figure n°36 représente les cinétiques obtenues pour des concentrations croissantes de bilirubine (50 à 400 mg/l).

La coloration verte présente une grande stabilité.

- sur le plan quantitatif :

On constate que :

1. A 595 nm, la loi de BEER-LAMBERT est respectée jusqu'à 200 mg/l de bilirubine.
2. Il existe un décalage spectral puisque le maximum d'absorption dans le mélange 4 est situé à 595 nm alors que dans le mélange de FERRO, il est situé à 615 nm. Cependant, sur le plan de la sensibilité, les densités optiques lues à 595 nm au bout de 1 h.30 avec ce mélange et à 615 nm au bout de 25 minutes pour le mélange de FERRO, sont pratiquement identiques pour des concentrations inférieures ou égales à 200 mg/l. (figure n°37).

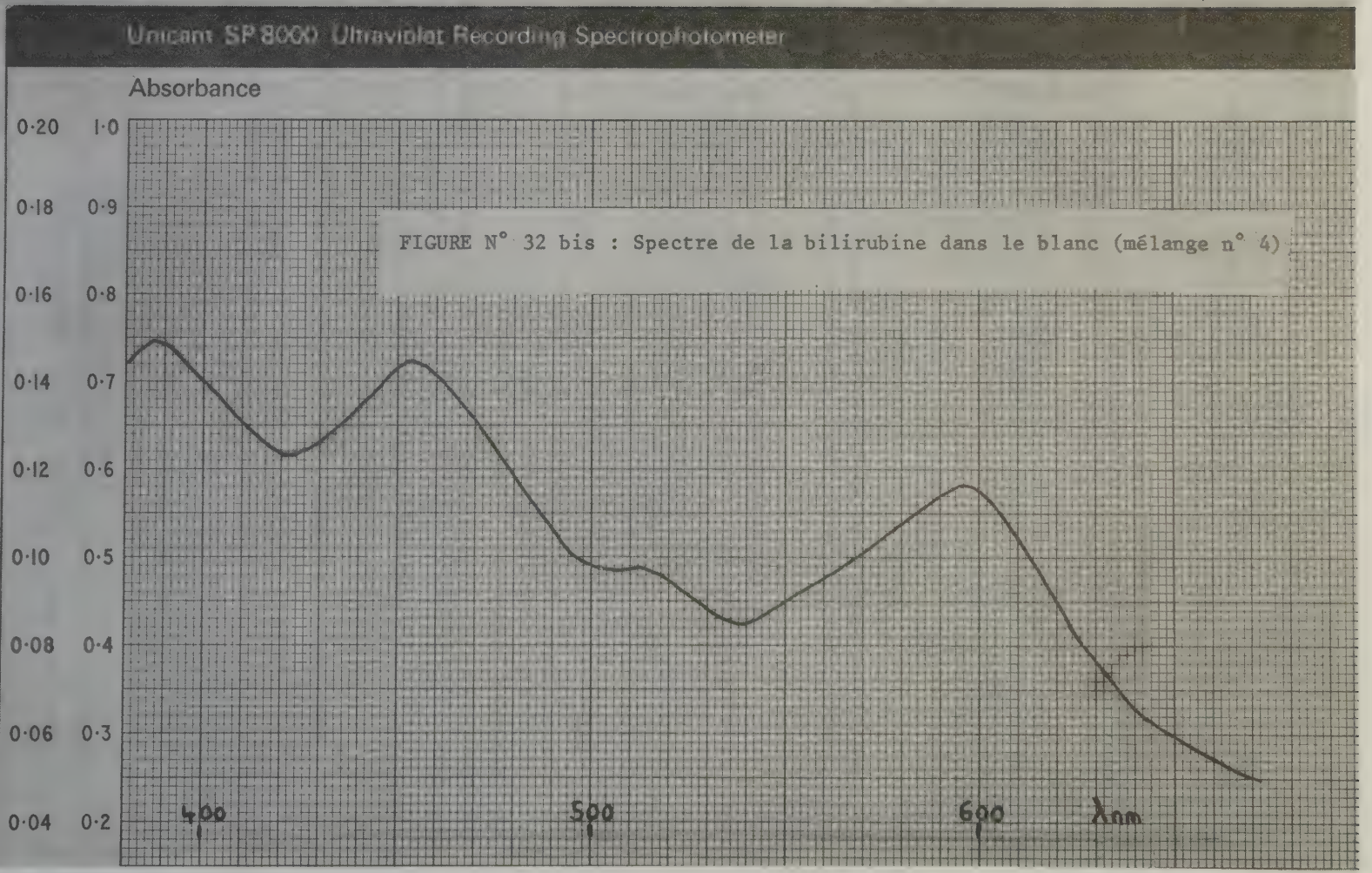
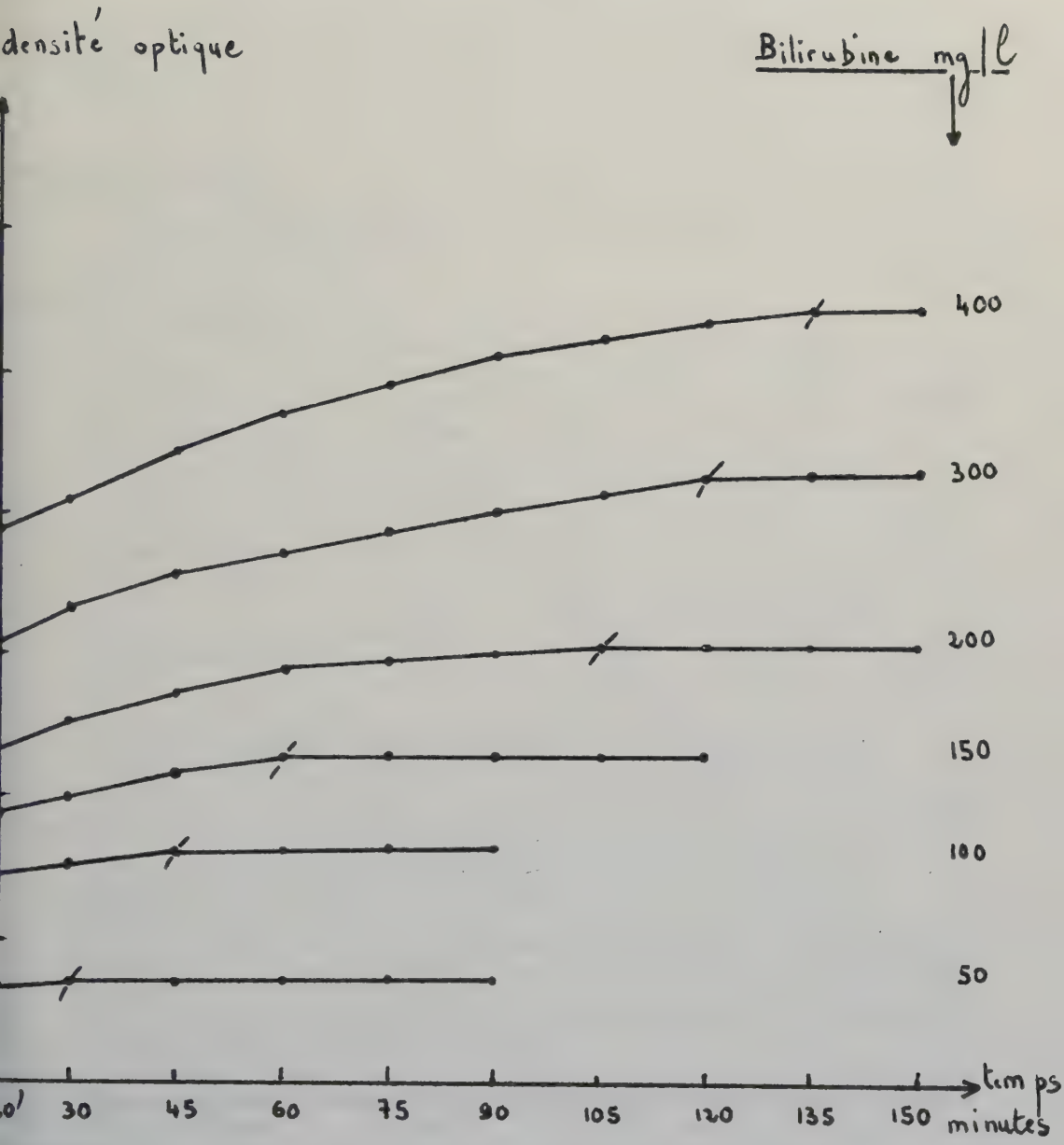


FIGURE N° 32 bis : Spectre de la bilirubine dans le blanc (mélange n° 4)



RE N° 36 : Cinétique de la bilirubine à 595 nm en fonction de sa concentration dans le blanc (mélange n° 4).

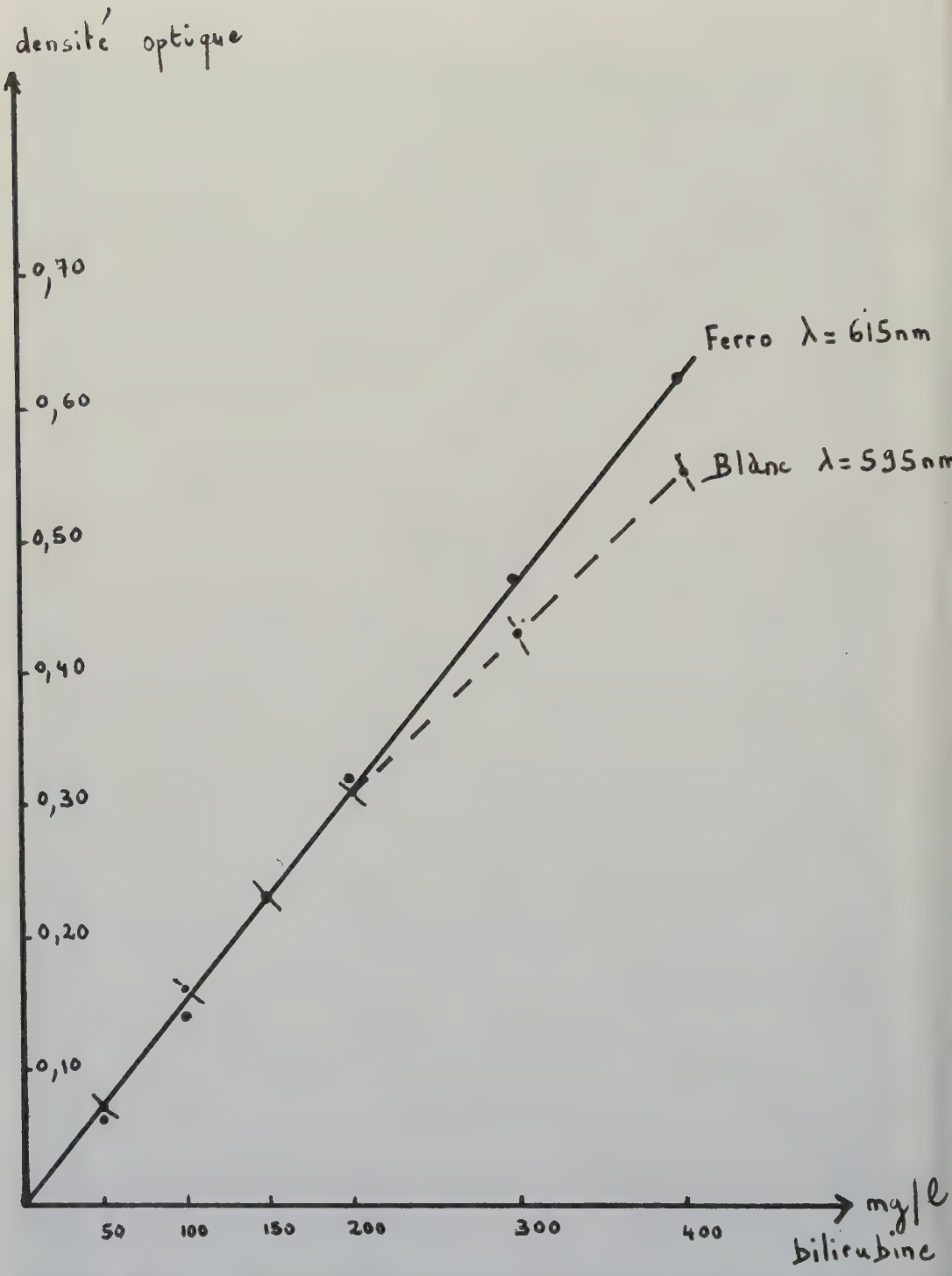


FIGURE N° 37 : Absorption de la bilirubine en fonction de sa concentration à 615 nm dans le mélange de Ferro et à 595 nm dans le blanc.

b) Le cholestérol :

Dans ce mélange réactionnel, le cholestérol donne une coloration jaune rosée dont le maximum d'absorption est situé à 490 nm. La cinétique est très lente, l'absorption à 595 nm est négligeable pendant une durée d'au moins 2 heures.

2. PROPOSITION DES MOYENS DE CORRECTION ET DISCUSSION DE LEURS LIMITES.

Cette étude spectrale nous conduit à proposer trois protocoles opératoires ayant pour but d'éliminer l'interférence de la bilirubine sérique dans le dosage du cholestérol en voie directe :

a) une correction graphique par lecture à deux longueurs d'onde,

b) une correction par blanc sur un mélange réactionnel modifié,

c) une correction empirique par calcul d'équivalence bilirubine/cholestérol.

a) Correction graphique par lecture à deux longueurs d'onde :

- Pour des concentrations inférieures ou égales à 150 mg/l, la bilirubine développe une réaction colorée d'intensité équivalente à 615 et 685 nm.

- A 615 nm, le cholestérol développe une réaction colorée dont l'intensité est double de celle obtenue à 685 nm.

- Soit A1, la densité optique obtenue à 615 nm pour un mélange cholestérol-bilirubine.

- Soit A2, la densité optique obtenue à 685 nm pour ce même mélange.

- En appliquant la formule suivante (A1-A2)x2, la densité optique obtenue correspond à l'absorption réelle du cholestérol.

Malheureusement, l'utilisation de cette correction graphique est limitée. Nous avons constaté que le comportement de la bilirubine à 615 et 685 nm est différent à partir de 150 mg/l.

L'application de cette formule a donné avec les solutions étalons de bilirubine DADE les résultats suivants:

Bilirubine DADE mg/l	*Incidence de la correction sur la cholestérolémie g/l*
50	0
100	0
150	0
200	0,20
300	0,36
400	0,58

La correction graphique est par conséquent valable pour des taux de bilirubine ne dépassant pas 150 mg/l.

Sa réalisation pratique peut en outre présenter un inconvénient sur le plan de l'appareillage. En effet, il est nécessaire d'utiliser un spectrophotomètre enregistreur avec étalement suffisant des densités optiques et de déterminer pour chaque type d'appareil les deux longueurs d'onde intéressantes pour le cholestérol. (longueur d'onde d'absorption maxima et longueur d'onde de demi-absorption).

b) *Correction par blanc sur mélange réactionnel modifié.*

Après l'étude réalisée sur les mélanges réactionnels préconisés comme "blanc bilirubine", nous avons testé le comportement du cholestérol sérique dans ces mêmes mélanges.

- *Les mélanges 2 et 3 :*

D'une part, les protéines sériques précipitant sous l'action de la forte concentration en acide acétique, il apparaît un trouble dans le mélange réactionnel qu'il n'est pas possible d'éliminer par centrifugation.

D'autre part, on constate qu'en milieu aqueux, la cinétique de développement de la réaction colorée du cholestérol est beaucoup plus rapide qu'en milieu chloroformique. L'intensité de la coloration obtenue à 615 nm au bout de 5 minutes n'est plus négligeable.

Il n'est donc pas possible d'utiliser ces deux mélanges en vue de la réalisation d'un blanc.

- Nous avons utilisé ensuite *le mélange 4 :* enrichi en acide sulfurique.

Dans ce cas-là, il n'est plus possible d'ajouter des ions ferriques car nous nous retrouverions alors dans les conditions de développement de la réaction de ZAK.

L'acide sulfurique dissout les protéines sériques et supprime le problème de turbidité rencontré dans les mélanges précédents.

Le cholestérol sérique ne développe aucune réaction à 595 nm. Nous l'avons vérifié sur 40 sérums contenant de 1 à 3 g/l de cholestérol et de 2 à 8 mg/l de bilirubine. Les densités optiques obtenues à cette longueur d'onde et lues au bout d'une heure varient entre 0,01 et 0,04.

L'emploi d'acide acétique MERCK dans la préparation du réactif est impérative. Nous avons en effet constaté, pour quelques sérums, en utilisant de l'acide acétique PROLABO le développement d'une coloration violette venant fausser les résultats.
Cette coloration violette n'apparait pas lorsqu'on emploie de l'acide acétique Merck.

La bilirubine :

La cinétique de l'oxydation de la bilirubine est par contre très ralentie (fig. n°36). Une durée d'environ 1 h.30 est nécessaire pour oxyder 200 mg de bilirubine.

Nous avons vu que cette correction par blanc est valable jusqu'à 200 mg/l de bilirubine.

En présence d'un sérum ictérique, nous proposons le protocole opératoire suivant :

+ Dans deux tubes à essais, on introduit :

	Dosage	*Blanc*
Mélange de FERRO.....	4 ml	-
Mélange 4.....	-	4 ml
Sérum.....	0,20 ml	0,20 ml

On agite pendant 30 secondes,

On effectue la lecture :

- entre 20 et 25 minutes à 615 nm pour le dosage,
- au bout de 1 h.30 à 595 nm pour le blanc, (ce qui tient compte à la fois du décalage spectral et cinétique).

+ Soit :

- A1 la densité optique obtenue pour le dosage,
- A2 la densité optique obtenue pour le blanc.

La différence A1-A2 représente la densité optique qui doit être reportée sur la courbe d'étalonnage du cholestérol, elle correspond à l'intensité de la coloration développée par lui seul.

+ Cette technique a donné, pour des concentrations de bilirubine comprises entre 50 et 400 mg/l, les résultats suivants :

Bilirubine DADE mg/l	*D. O. 615 nm Dosage*	*D. O. 595 nm Blanc*	*Incidence de la correction sur la cholestérolémie g/l*
50	0,06	0,07	- 0,04
100	0,14	0,16	- 0,08
150	0,23	0,23	0
200	0,32	0,31	+ 0,04
300*	0,47	* 0,43	+ 0,12
400	0,62	* 0,55	+ 0,28

Jusqu'à 200 mg/l la réalisation d'un blanc sérum dans ces conditions avec le mélange réactionnel que nous préconisons élimine totalement l'interférence de la bilirubine dans la réaction de Liebermann-Burchard effectuée en voie directe.

c) *Correction empirique par calcul d'équivalence bilirubine/cholestérol.*

Cette méthode consiste à chiffrer l'équivalence bilirubine-cholestérol : on développe des réactions de Liebermann-Burchard avec de la bilirubine en concentration connue, les densités optiques obtenues à 615 nm sont reportées sur une courbe d'étalonnage réalisée avec du SERACHOL.

Nous avons obtenu les résultats suivants, en réalisant cette expérience avec de la bilirubine DADE :

* *Lecture au bout de 2 heures.*

Bilirubine mg/l	*Equivalence en cholestérol g/l*	*Cholestérol g/l pour 100 mg de bilirubine*
50	0,26	0,52
100	0,58	0,58
150	0,95	0,63
200	1,30	0,65
300	1,92	0,64
400	2,56	0,64

100 mg de bilirubine équivalent en moyenne à 0,60 g/l de cholestérol.

+ Cette étude expérimentale théorique montre qu'il est possible d'éliminer l'interférence de la bilirubine par trois types de corrections :

- la correction graphique jusqu'à 150 mg/l,
- la correction par blanc jusqu'à 200 mg/l,
- la correction empirique.

+ Dans une deuxième étape, nous avons tenté d'appliquer ces différents procédés au sérum :

a) après surcharge en bilirubine,

b) sur des sérums "ictériques".

3. APPLICATION DE CES METHODES AU SERUM.

a) Après surcharge en bilirubine :

Cette expérience est réalisée avec :

- un sérum non ictérique à taux élevé de cholestérol que l'on dilue avec une solution de bilirubine DADE,
- et avec une solution étalon de cholestérol en solution aqueuse PRECISET-BOEHRINGER. On regénère la bilirubine lyophylisée avec cette solution étalon.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux n° 15 et n°16.

La méthode par surcharge confirme l'étude théorique tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

b) Sérums ictériques :

Nous avons analysé 68 sérums ictériques sur lesquels nous avons déterminé :

- d'une part, le taux de bilirubine. Celui-ci a varié de 20 à 465 mg/l. La figure n°38 représente la répartition des taux de bilirubine par tranches de 50 mg.
- d'autre part, le taux de cholestérol par la méthode directe et par la méthode semi-extractive selon le protocole de FORBES (48), et en appliquant les différents modes de correction proposés.
  Le tableau n°17 résume les paramètres statistiques de distribution des différentes données.

Nous avons ensuite comparé les résultats fournis par les diverses méthodes à la méthode semi-extractive que nous avons choisie comme méthode de référence puisqu'elle élimine totalement la bilirubine.
Les courbes de régression obtenues pour chaque méthode étudiée sont reportées dans les figures 39 à 42. Les équations de ces courbes sont résumées dans le tableau n°18.

TABLEAU N° 15 - Résultats obtenus après surcharge en bilirubine d'un sérum non ictérique

Sérum	Surcharge en bilirubine mg/l	Ferro direct			Correction graphique	Blanc		Equivalence
		D.O. (cuve 10 mm) 615 nm	685 nm	Cholestérol g/l	Cholestérol g/l	D.O. (cuve 10 mm) 595 nm	Cholestérol g/l	Cholestérol g/l
Sérum natif	0	0,64		2,85	-	0,01	-	-
dilué 3/4	0	0,50	0,25	2,22				
	+100	0,65	0,39	2,90	2,30	0,14	2,25	2,30
dilué 1/2	0	0,33	0,16	1,50				
	+200	0,61	0,43	2,72	1,70	0,26	1,65	1,52
dilué 1/4	0	0,17	0,08	0,75				
	+300	0,61	0,46	2,72	1,34	0,37	1,07	0,92

TABLEAU N° 16 - Résultats obtenus après surcharge en bilirubine d'une solution aqueuse de Cholestérol (Preciset Boehringer)

Cholestérol g/l	*Surcharge en bilirubine mg/l*	*Ferro direct*			*Correction graphique*	*Blanc*		*Equivalence*
		D.O. (cuve 10 mm) 615 nm	*685 nm*	*Cholestérol g/l*	*Cholestérol g/l*	*D.O. (cuve 10 mm) 595 nm*	*Cholestérol g/l*	*Cholestérol g/l*
P2 g/l	0	0,40	0,20	2		0,03 D.O.déduite		
P2 g/l	50	0,45	0,24	2,25	1,95	0,05	2	1,95
P2 g/l	100	0,51	0,31	2,55	2	0,12	1,95	1,95
P2 g/l	200	0,66	0,43	3,30	2,30	0,26	2	2,10
P2 g/l	400	0,90	0,62	4,50	2,80	0,44	2,30	2,10

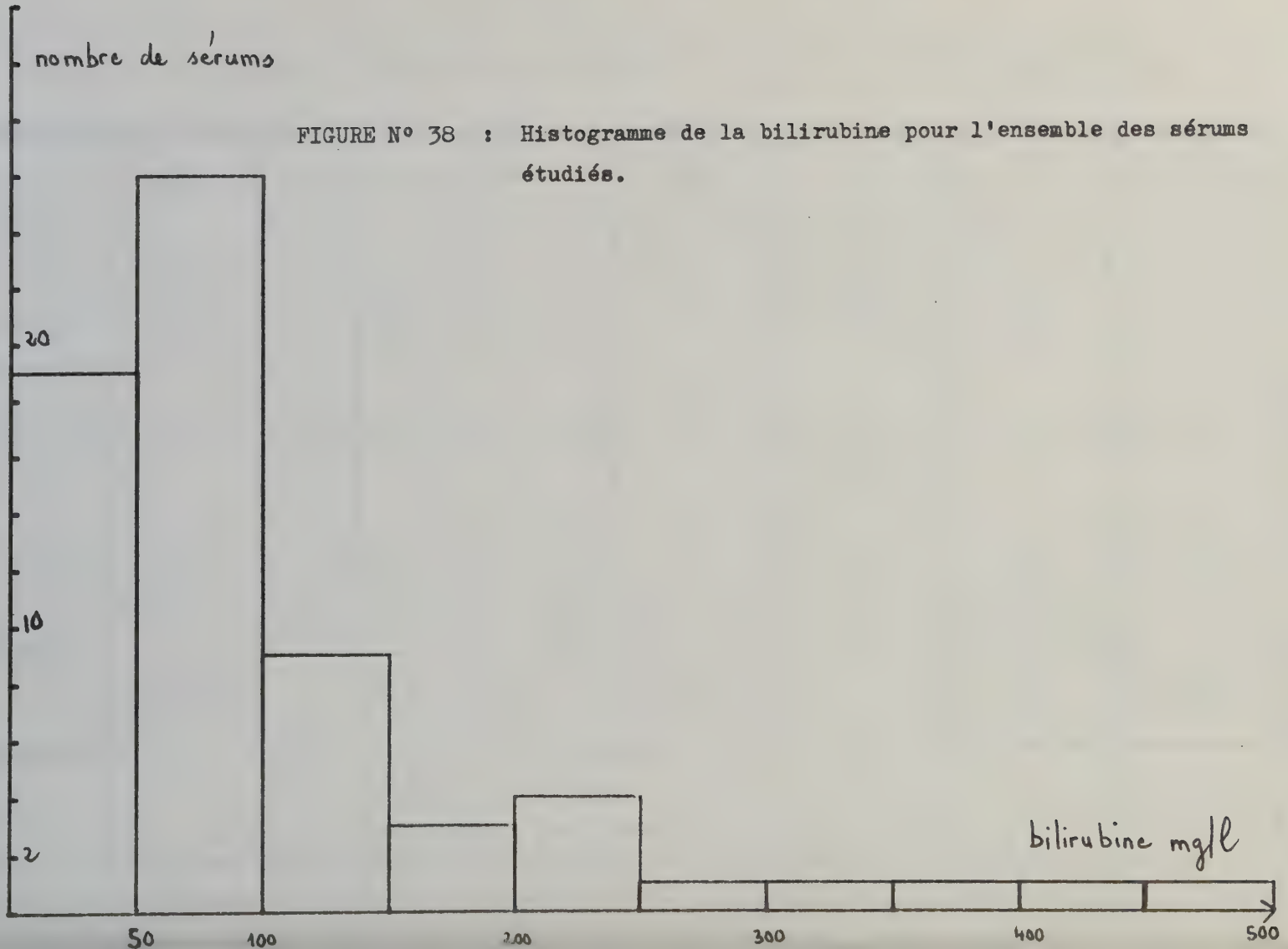


FIGURE N° 38 : Histogramme de la bilirubine pour l'ensemble des sérums étudiés.

TABLEAU N° 17 - Paramètres statistiques de distribution des différentes données.

N=68 *Cholestérol (g/l)*	*Moyenne (g/l)*	*Variance*	*Ecart-type*	*Coefficient de variation*	*Minimum (g/l)*	*Maximum (g/l)*
Référence Méthode semi-extractive	1,74	0,42	0,65	2,70	0,60	3,35
Ferro direct	2,44	0,80	0,90	2,73	0,80	4,90
Correction graphique	1,83	0,42	0,645	2,84	0,55	3,55
Equivalence	1,78	0,48	0,69	2,57	0,60	3,40
Blanc	1,79	0,39	0,63	2,84	0,55	3,30

TABLEAU N° 18 - Equations des courbes de régression

	r^2	r	*Equation de la droite*	*v (y en x)*
Ferro direct	0,41	0,64	y=0,90 + 0,89 x	0,48
Correction graphique	0,85	0,92	y=0,23 + 0,92 x	0,065
Equivalence	0,86	0,93	y=0,05 + 0,99 x	0,07
Blanc	0,92	0,96	y=0,17 + 0,93 x	0,03

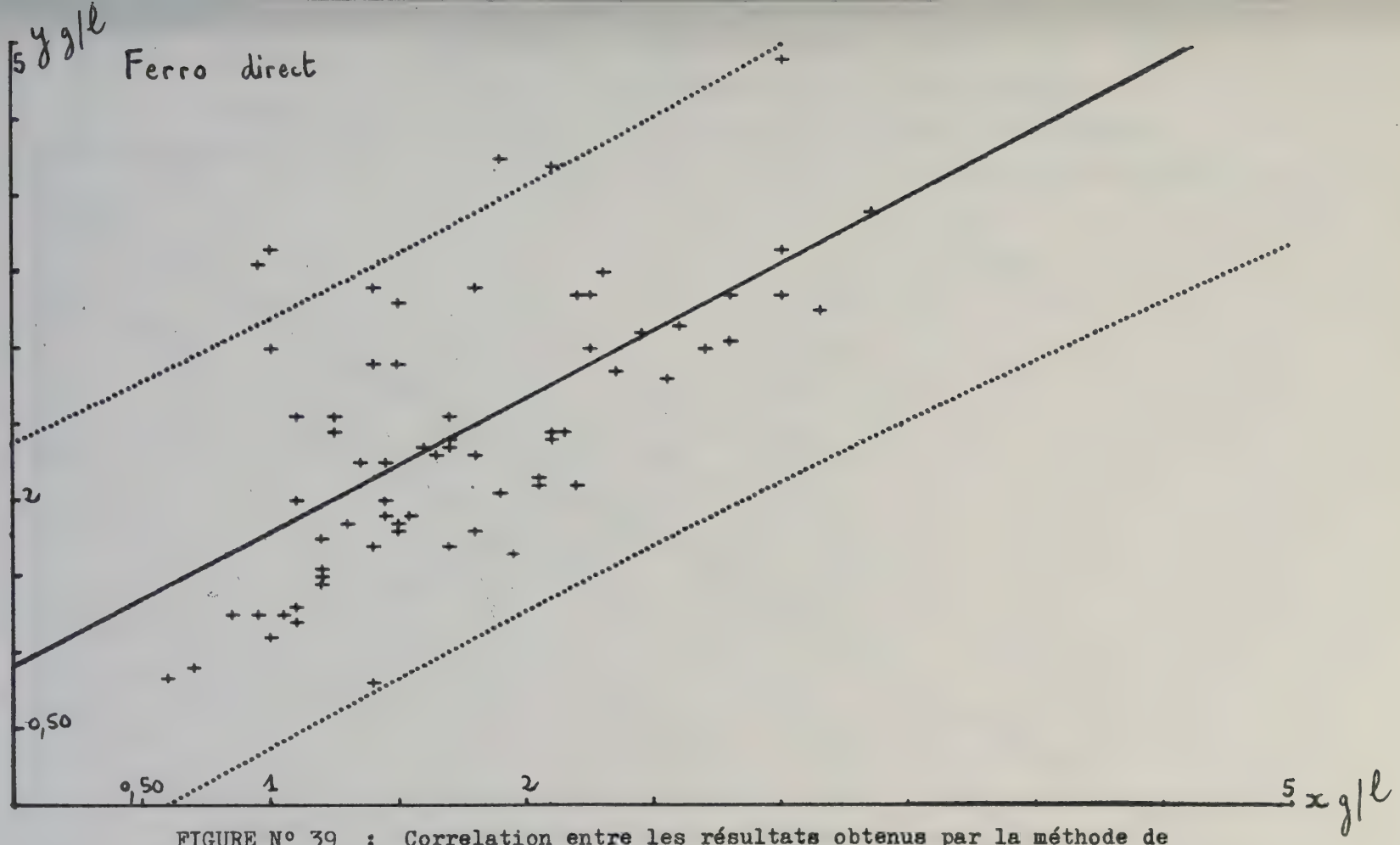


FIGURE N° 39 : Correlation entre les résultats obtenus par la méthode de Ferro aprés extraction (x) et par la méthode de Ferro en voie directe (y).

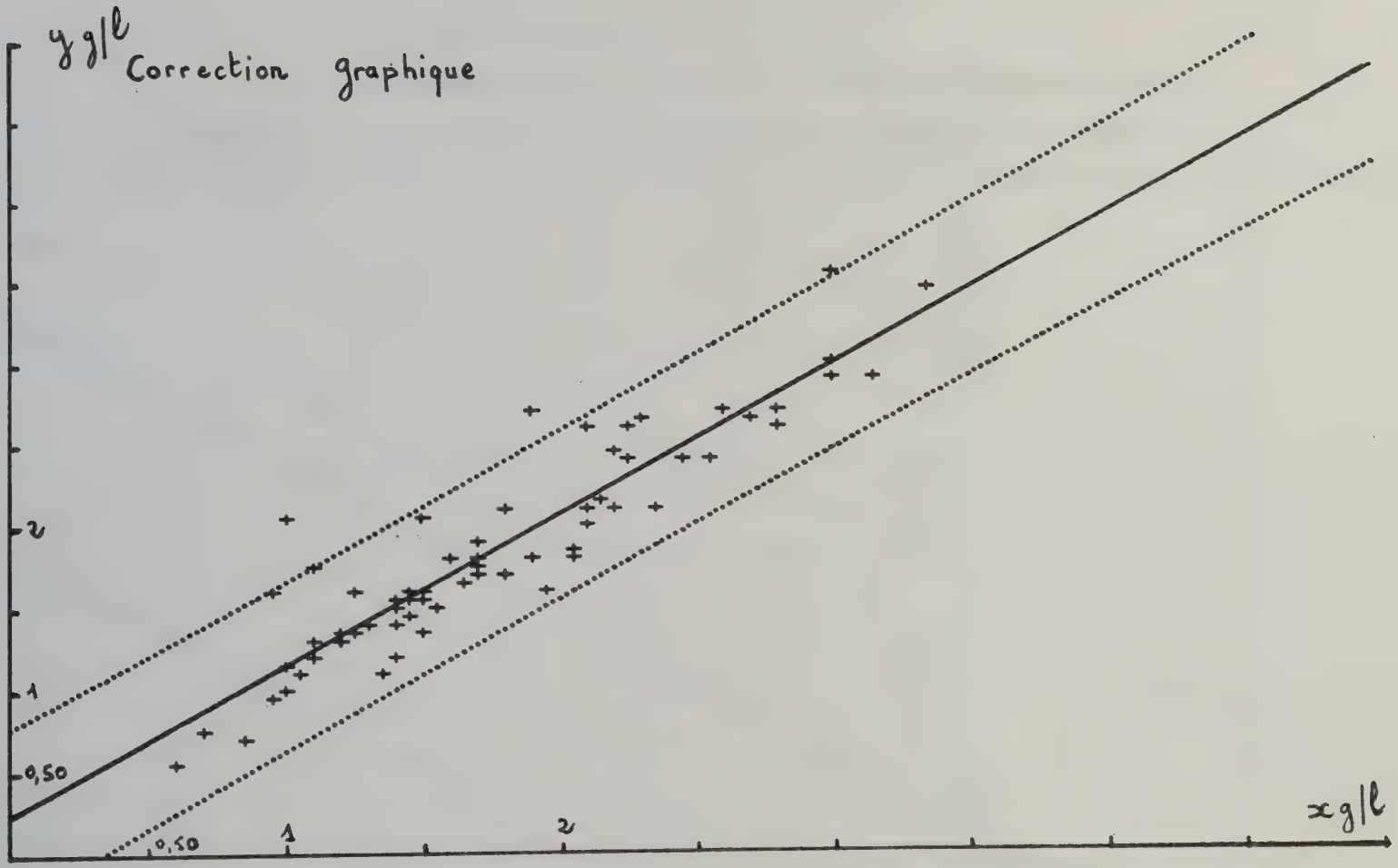


FIGURE N° 40 : Correlation entre les résultats obtenus par la méthode de Ferro aprés extraction (x) et par la méthode utilisant la correction graphique (y).

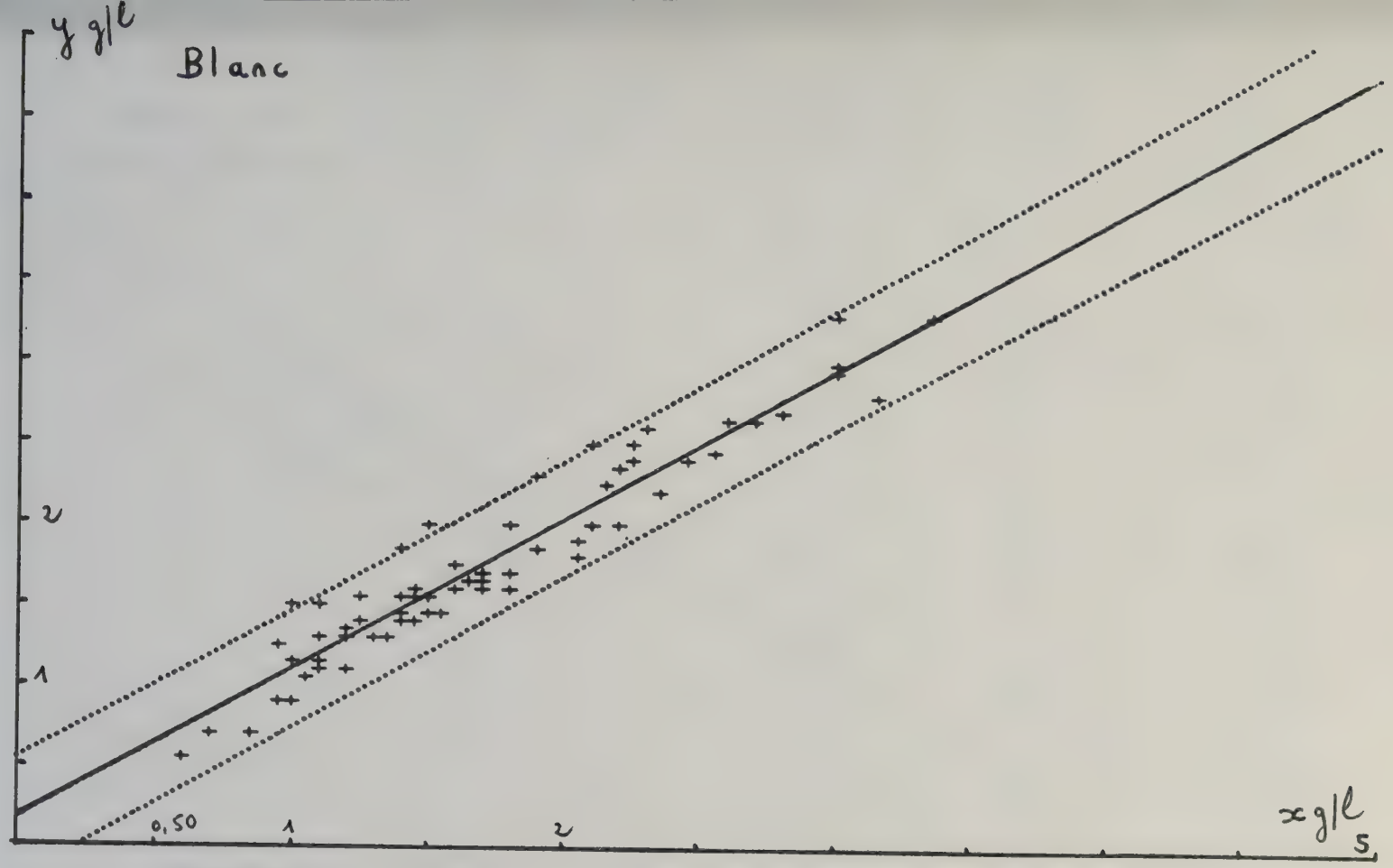


FIGURE N° 41 : Correlation entre les résultats obtenus par la méthode de Ferro aprés extraction (x) et par la méthode utilisant un blanc (y).

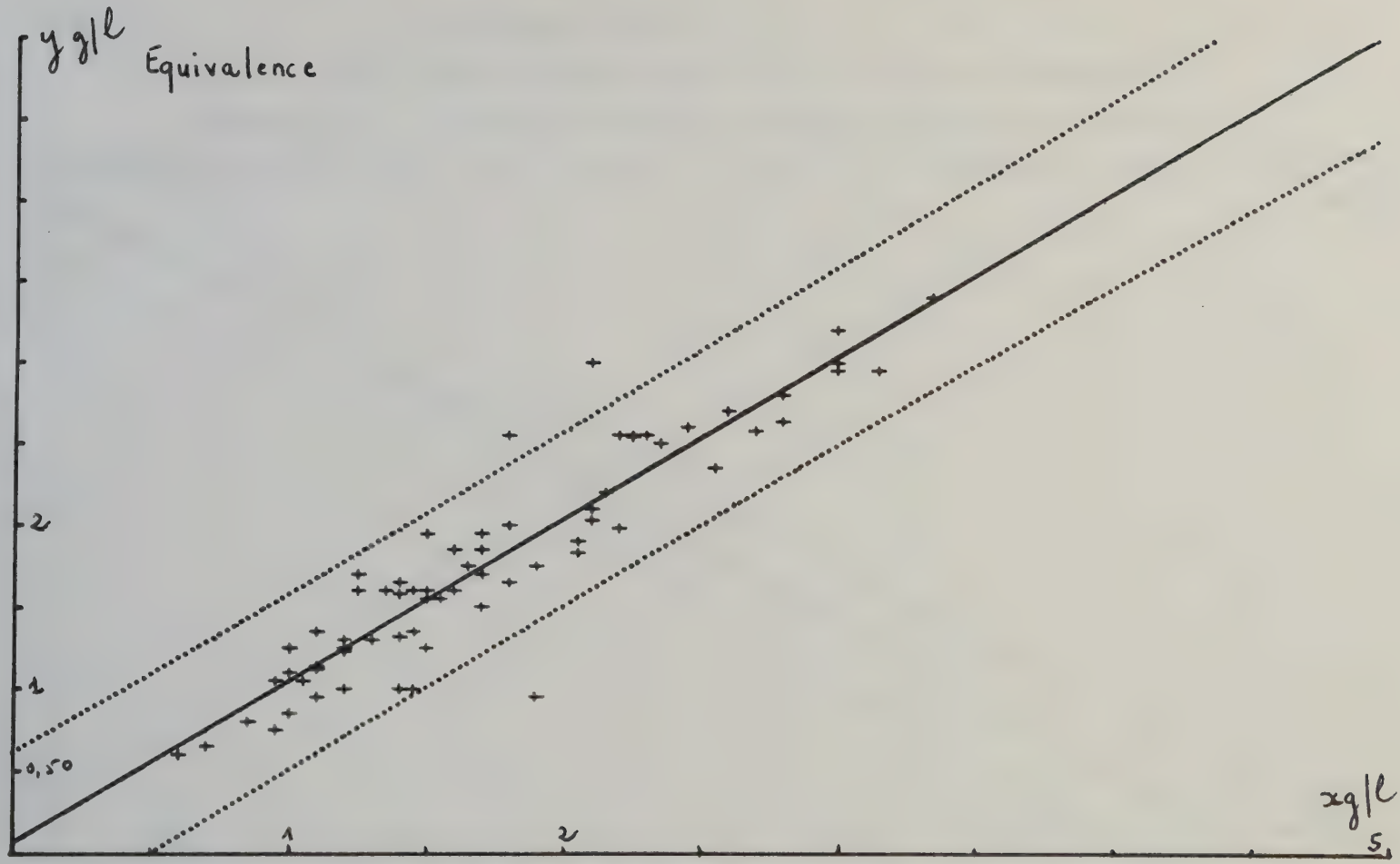


FIGURE N° 42 : Correlation entre les résultats obtenus par la méthode de Ferro aprés extaction (x) et par calcul d'équivalence (y).

Les échantillons étant distribués normalement (test de KOLMOGOROV-SMIRNOV et test de DAVID), la meilleure image qui existe entre les différentes valeurs est le coefficient de corrélation r ; nous avons trouvé r égal à :

- 0,64 par la méthode directe,
- 0,92 par la méthode par correction graphique,
- 0,93 par la méthode par calcul d'équivalence,
- 0,96 par la méthode par blanc. C'est par conséquent cette dernière méthode qui reflète le mieux la valeur de référence.

Cela se voit d'ailleurs lorsqu'on compare les différents nuages de points obtenus en plaçant la méthode de référence en x et la méthode à comparer en y où l'on s'aperçoit que l'intervalle de sécurité à 0,05 (espace compris entre les deux courbes en pointillés) est plus étroit pour la méthode par blanc que pour les deux autres modes de correction proposés.

--oOo--

QUATRIÈME PARTIE

ÉTUDE ANALYTIQUE DES RÉACTIONS DE LIEBERMANN-BURCHARD, SALKOWSKI ET ZAK EN SPECTROFLUORESCENCE

Si la spectrofluorescence est très utilisée pour le dosage des stéroïdes hormonaux en particulier, elle ne l'est pratiquement pas pour le dosage du cholestérol. Les travaux consacrés à ce dernier sont peu nombreux et ils n'ont pas reçu d'application réelle en biologie clinique.

A l'heure actuelle on constate paradoxalement que la spectrofluorescence, technique analytique très performante sur le plan de la sensibilité, connaît un développement considérable dans tous les domaines. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'aborder à nouveau ce sujet à la fois sur le plan théorique et sur le plan pratique.

L'étude théorique de la fluorescence développée par les réactions de Liebermann-Burchard et de "Salkowski-Zak" fait l'objet de cette quatrième partie de notre travail. La cinquième partie est consacrée aux applications de la spectrofluorescence au dosage du cholestérol dans divers milieux biologiques.

Nous envisagerons successivement :

I. RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS.

II. MATERIEL ET METHODES.

III. TRAVAIL EXPERIMENTAL :

1. Etude analytique de la réaction de Liebermann-Burchard.
2. Etude analytique des réactions de Salkowski et de Zak.
3. Discussion des résultats.

I. RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS.

Comme nous l'avons déjà vu dans l'introduction, les méthodes de dosage du cholestérol en fluorescence sont basées sur les trois réactions colorées classiques :

- la réaction de Liebermann-Burchard,
- la réaction de Salkowski-Zak,
- la réaction de Tschugaeff ;

la réalisation pratique de cette dernière étant dangereuse pour les raisons déjà signalées, nous ne l'avons pas étudiée.

1. LA REACTION DE LIEBERMANN - BURCHARD.

Le tableau n°19 résume les principales caractéristiques des protocoles opératoires basés sur cette réaction.

a) Ils se différencient par le nombre des étapes précédant le dosage proprement dit. On rencontre les protocoles extractif, semi-extractif et semi-direct. Aucun protocole direct n'est décrit.

b) Le mélange réactionnel est constitué d'acide sulfurique, d'acide acétique, d'anhydride acétique et de trichloréthane dans des proportions relatives sensiblement identiques pour les différentes méthodes.

L'addition des réactifs s'effectue :

- en trois temps (99, 155),
- en deux temps (24),
- en un seul temps - KOVAL (89) et ROBERTSON (131) utilisent un mélange réactionnel entièrement constitué. La sensibilité de la réaction est alors multipliée par deux.

TABLEAU N° 19 - Caractéristiques des protocoles découlant de la réaction de Liebermann-Burchard détectée en fluorescence.

METHODES	*ALBERS-LOWRY 1955 (2)*	*CARPENTER 1956 (24)*	*MAC DOUGAL et FARMER 1957 (99)*	*TOURTE-TELOTTE 1959 (155)*	*KOVAL 1961 (89)*	*ROBERTSON 1970 (131)*
1) PROTOCOLE - extractif	Ethanol	Ether de pétrole (saponification)		Ethanol	Ethanol	
- semi-extractif						Chloroforme méthanol
- semi-direct (centrifugation)			+			
2) MELANGE REACTIONNEL =composition					entièrement constitué ↓	
-acide sulfurique volume	1	1	1	1	1	1
-acide acétique volume	-	-	0,6	0,53	-	-
-anhydride acétique volume	4	4,16	4,15	4,50	4	4
-trichloréthane volume	21	20,8	25	22,4	21	20
=volume final	161 µl	2,08 ml	1,08 ml	1,06 ml	1 ml	3 ml
3) SENSIBILITE µl sérum		10	4			21
µg de cholestérol/volume final	0,1 - 10	20	8		1-10	40
4) NATURE DE L'ECHANTILLON tissus	+					
sérum		+	+		+	+
liquide céphalo-rachidien				+		
5) LECTURE	λ Excitation = 540 nm ; λ Emission = 590 nm					

c) Conditions de lecture.

Tous les auteurs utilisent une longueur d'onde d'excitation de 540 nm et une longueur d'onde d'émission à 590 nm sans apporter de justification spectrale à ce choix.

Ces méthodes sont applicables à la détermination du cholestérol dans les tissus, le sérum et le liquide céphalo-rachidien. Elles sont longues, les volumes mesurés souvent très faibles les rendant peu reproductibles à l'exception de la méthode de ROBERTSON qui a d'ailleurs fait l'objet d'une adaptation autoanalytique.

2. LA REACTION DE ZAK.

Ses applications en fluorescence sont très réduites. Deux techniques sont décrites par SOLOW (147) et BADZIO (9). Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau n°20.

Aucun protocole direct n'est décrit pour cette réaction. Les conditions opératoires sont tout à fait différentes sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif : en particulier le choix des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. SOLOW justifie ce choix en montrant l'allure des différents spectres.

TABLEAU N° 20 - Caractéristiques des protocoles découlant de la réaction de Zak détectée en fluorescence.

	SOLOW 1970 (147)	*BADZIO 1975 (9)*
1) PROTOCOLE		
- extractif	-	Ethanol - éther
- semi-extractif	Isopropanol	
2) MELANGE REACTIONNEL		
- composition		
. acide sulfurique	2 V	2,5 V
. solvant	Acide acétique 2 V	Acétate d'éthyle 1 V
. perchlorure de fer/6 H_2O	250 mg/l	143 mg/l
- volume final	5 ml (1 ml extrait)	2,20 ml
3) SENSIBILITE		
- sérum µl	0,5	5 à 10
- µg de cholestérol / ..... volume final	1	0,5 -
4) ECHANTILLON		
- sérum	+	+
- liquide céphalo-rachidien	+	
- fraction électrophorèse Lp		+
5) LECTURE		
- λ Excitation	525 nm	400 - 436 nm
- λ Emission	565 nm	500 nm

II. MATERIEL ET METHODES.

A. MATERIEL.

a) PRODUITS CHIMIQUES.

- acides et solvants Merck,
- perchlorure de fer 6 H_2O Merck,
- perchlorate ferrique 7 H_2O Fluka,
- cholestérol et esters Sigma,
- étalon sérique de cholestérol : sérachol *
- bilirubine Dade.

b) REACTIFS.

- mélange réactionnel de Ferro classique :
  - acide sulfurique 2 volumes,
  - anhydride acétique 5,5 volumes,
  - acide acétique 4,5 volumes.
- mélange réactionnel de Zak classique :
  - acide sulfurique 2 volumes,
  - acide acétique 3 volumes,
  - perchlorure de fer 6 H_2O 500 mg/l. conservation en flacon brun.
- solutions de cholestérol et de ses esters dans le chloroforme et dans l'isopropanol.

* *Laboratoire PRECIBIO.*

c) APPAREILLAGE.

- Unicam Philips SP 800 pour les études en colorimétrie,
- Fluoriscimètres :
  - . Sebia CGA 3000
  - . JY_3 Jobin Yvon,
  - . Perkin Elmer MPF_3.
- verrerie lavée au mélange sulfochromique et rincée trois fois à l'eau distillée,
- Micropipettes smi (Block).

B. METHODES.

L'ensemble de notre expérimentation est réalisée avec des mélanges réactionnels entièrement constitués. Le mode opératoire est le suivant :

- pour la méthode de Liebermann-Burchard :

  0,20 ml d'échantillon à analyser dans 4 ml de mélange réactionnel.

- pour la méthode de Salkowski-Zak :

  0,10 ml d'échantillon à analyser dans 5 ml de mélange réactionnel.

N.B.- Toutes les intensités de fluorescence de nos expérimentations ont été exprimées en unités arbitraires procentuelles (échelle du galvanomètre de 0 à 100) affectées de la sensibilité correspondante :
- en effet l'appareil CGA 3000 Sebia comporte 5 sensibilités (1 - 2 - 3 - 4 - 5); pour des raisons de stabilité, nous avons toujours travaillé sur les échelles 3 ou 4. La relation entre les deux est la suivante :

$$I_F \text{ (échelle 3)} = I_F \text{ (échelle 4)} \times 4$$

Par ailleurs un bouton à deux positions (1 et 0,5) permet sur la position 0,5 de diviser par deux les intensités lues sur le galvanomètre. Exemple :

- une intensité de fluorescence lue sur l'échelle 3/1 I_F (échelle 3/1) = 80 donne 40 sur l'échelle 3/0,5. En utilisant l'échelle x/0,5, les valeurs comprises entre 50 et 100 sur le galvanomètre correspondent en fait à des valeurs équivalentes comprises entre 100 et 200 sur l'échelle x/1. En multipliant les valeurs lues sur l'échelle x/0,5 par deux, on peut donc étendre les modalités d'expression en unités arbitraires entre 0 et 200.

III. TRAVAIL EXPERIMENTAL.

Nous envisagerons successivement l'étude de la réaction de Liebermann - Burchard, de Salkowski et de Zak.

I. ETUDE ANALYTIQUE DE LA REACTION DE LIEBERMANN-BURCHARD.

Cette étude est réalisée avec une solution chloroformique de cholestérol.

A. ASPECT QUALITATIF.

a) Spectre d'excitation et spectre d'émission. (figure n°43 - appareil JY_3).

- le spectre d'excitation présente trois pics très aigus respectivement situés à 446 - 468 et 472 nm avec prédominance nette du pic à 468 nm.

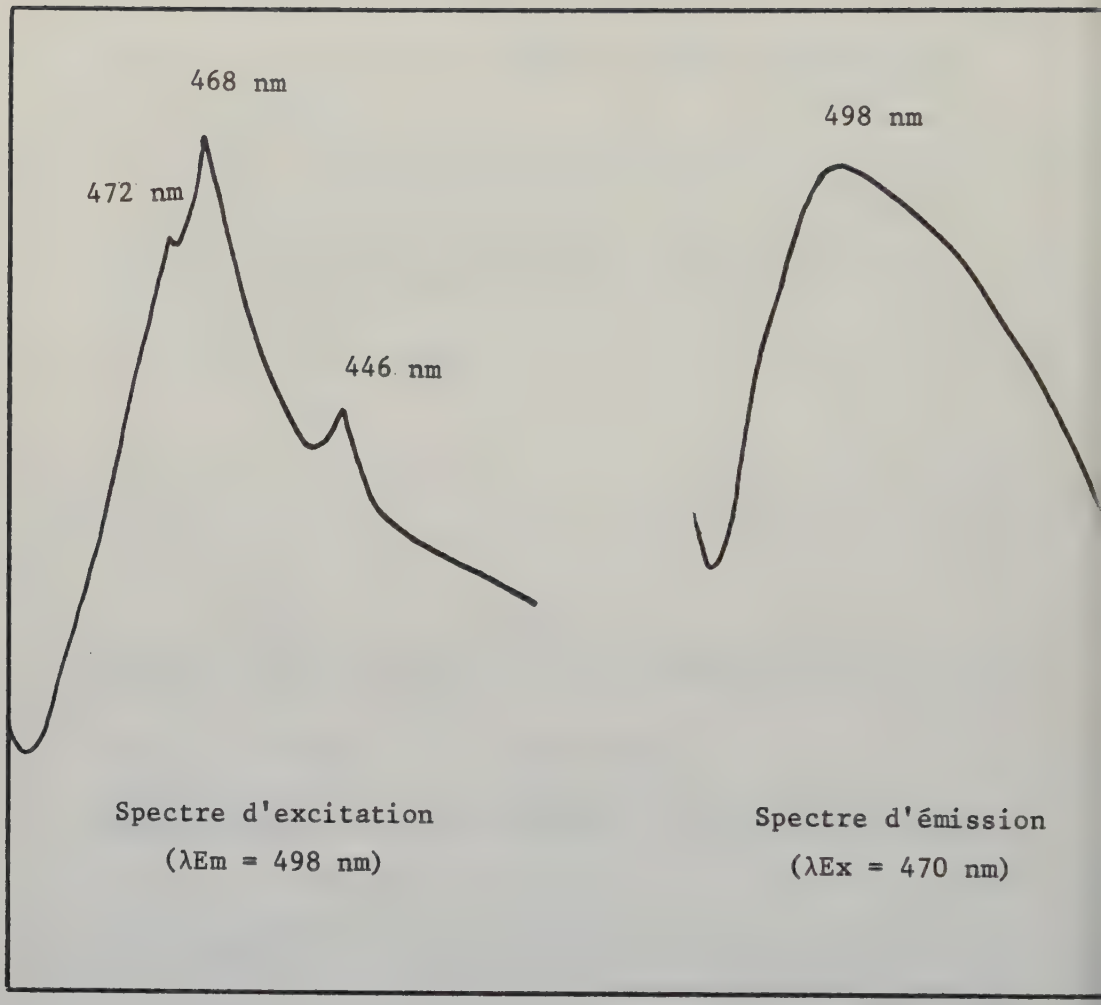


FIGURE N° 43 : Spectres d'excitation et d'émission du cholestérol dans la réaction de Liebermann - Burchard (JY_3)

- le spectre d'émission est caractérisé par un seul pic légèrement domé à 498 nm.

Suivant l'appareil utilisé on observe un faible décalage des spectres.

Avec le Perkin Elmer MPF_3, nous avons obtenu :

- pour le spectre d'excitation : trois pics situés à 455 - 470 et 480 nm avec prédominance du pic à 470 nm.
- pour le spectre d'émission : un pic à 505 nm.

Avec le spectrofluorescimètre Sebia CGA 3000 on obtient :

λ Excitation = 470 nm.

λ Emission = 505 nm.

b) *Cinétique réactionnelle.*

Elle est schématisée dans la figure n°44 (mélange n°2). Elle est très rapide, le maximum de fluorescence est atteint au bout de dix minutes puis l'intensité diminue très rapidement durant les vingt minutes suivantes pour se stabiliser au bout de quarante minutes. Elle se maintient pendant plus d'une heure.

B. ASPECT QUANTITATIF.

1. Choix d'un mélange réactionnel.

Comme nous l'avons réalisé en colorimétrie, nous avons étudié l'influence de l'acide sulfurique et de l'anhydride acétique sur la réaction de Liebermann-Burchard détectée en fluorescence.

a) Influence de l'acide sulfurique.

Pour deux mélanges réactionnels I et II renfermant des proportions constantes d'acide acétique et d'anhydride acétique, nous avons fait varier la concentration en acide sulfurique de 8,33 pour 100 à 33,33 pour 100. La composition de ces divers mélanges est résumée dans le tableau n°21.

TABLEAU N° 21 - Influence de la concentration en acide sulfurique : composition des mélanges réactionnels étudiés.

MELANGE I : Anhydride Acétique 55 V, Acide Acétique 45 V				
Mélanges réact.	1	2	3	4
$H_2 SO_4$	1	2	3	4
Mélange I	11	10	9	8
$\frac{\% H_2 SO_4}{\text{Mél. Réact. Final}}$	8,33 %	16,66 %	25 %	33,3 %

MELANGE II : Anhydride Acétique 40 V, Acide Acétique 60 V				
Mélanges réact.	1	2	3	4
$H_2 SO_4$	1	2	3	4
Mélange II	11	10	9	8
$\frac{\% H_2 SO_4}{\text{Mél. Réact. Final}}$	8,33 %	16,66 %	25 %	33,3 %

- *Sur le plan spectral :*

L'acide sulfurique ne modifie pas les données spectrales.

- *Sur le plan cinétique* (figures 44 et 45) :

Il faut remarquer que les mélanges riches en acide sulfurique sont visqueux, l'agitation lors du déclenchement de la réaction provoque la formation de bulles ce qui rend impossible les lectures avant dix à quinze minutes.

Pour les deux mélanges, à l'exception du mélange II_4, la cinétique est très rapide et indépendante de la concentration en acide sulfurique. Le maximum d'intensité est atteint entre la dixième et la quinzième minute.

Il n'en est pas de même sur le plan de la stabilité réactionnelle :

- une concentration de 16,66 pour 100 développe des réactions très instables, la fluorescence diminue dès la quinzième minute ;
- les concentrations de 25 à 33,33 pour 100 conduisent à une stabilité d'au moins quarante minutes, puis l'intensité diminue d'autant plus rapidement que la concentration en anhydride acétique est importante.

- *Sur le plan de la sensibilité :*

Les figures 46 et 47 représentent les résultats fournis par les différents mélanges pour deux concentrations égales à 8 et 16 µg de cholestérol dans la prise d'essai (0,20 ml). On constate que l'intensité de la fluorescence est directement liée à la teneur en acide sulfurique. Les mélanges contenant 33,33 pour 100 donnent des résultats très supérieurs à ceux obtenus avec les autres mélanges. Les concentrations égales à 25 et 33,33 pour 100 pour les deux mélanges conduisent à des réactions d'autant plus intenses que la concentration en anhydride acétique est grande.

b) Influence de l'anhydride acétique.

Nous avons constitué deux séries de mélanges réactionnels A et B renfermant respectivement deux volumes

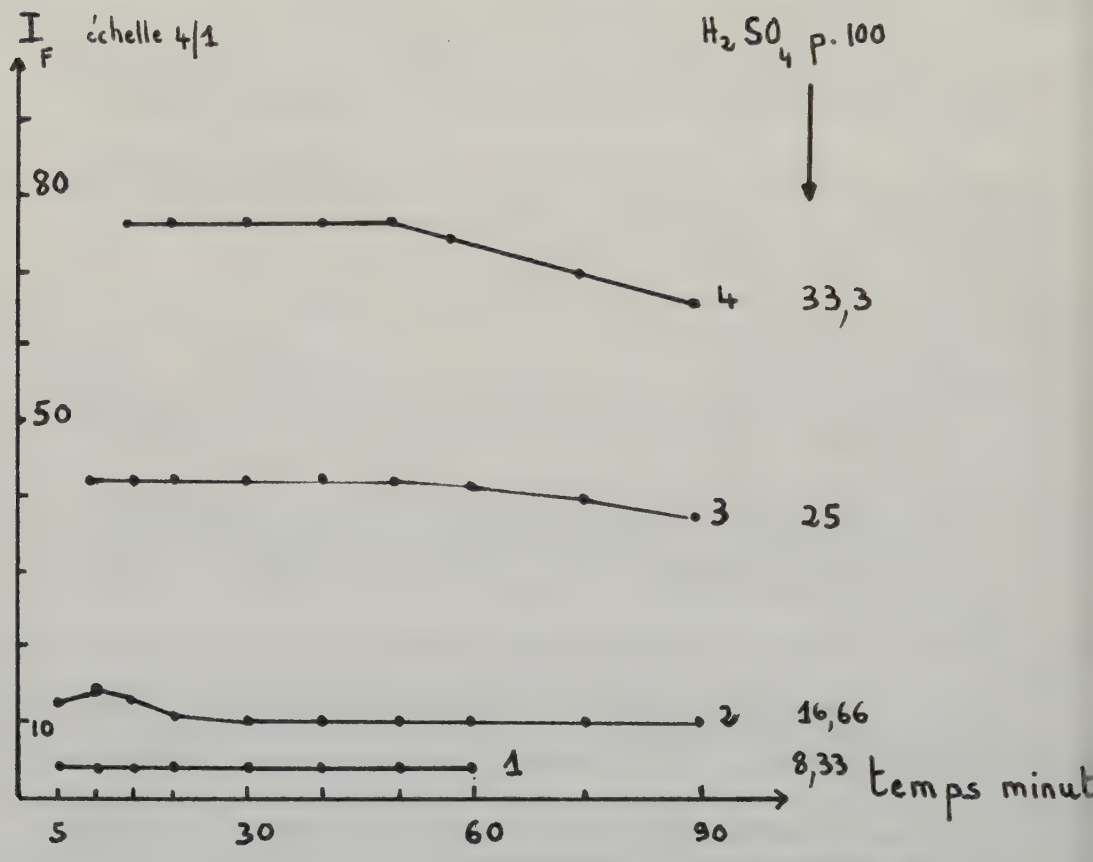


FIGURE N° 44 : Cinétique en fonction de la concentration en acide sulfurique (mélange I).

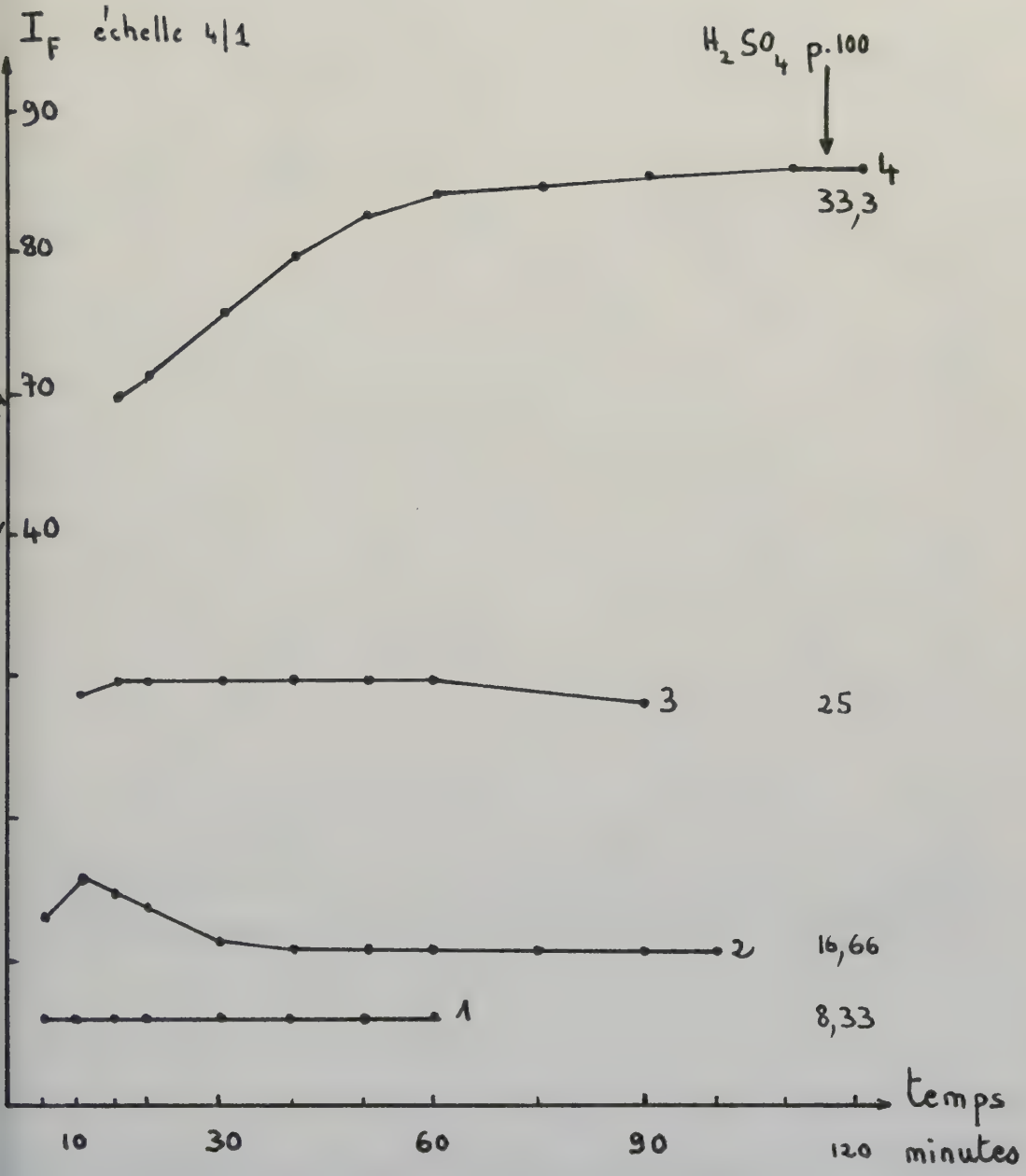


FIGURE N° 45 : Cinétique en fonction de la concentration en acide sulfurique (mélange II).

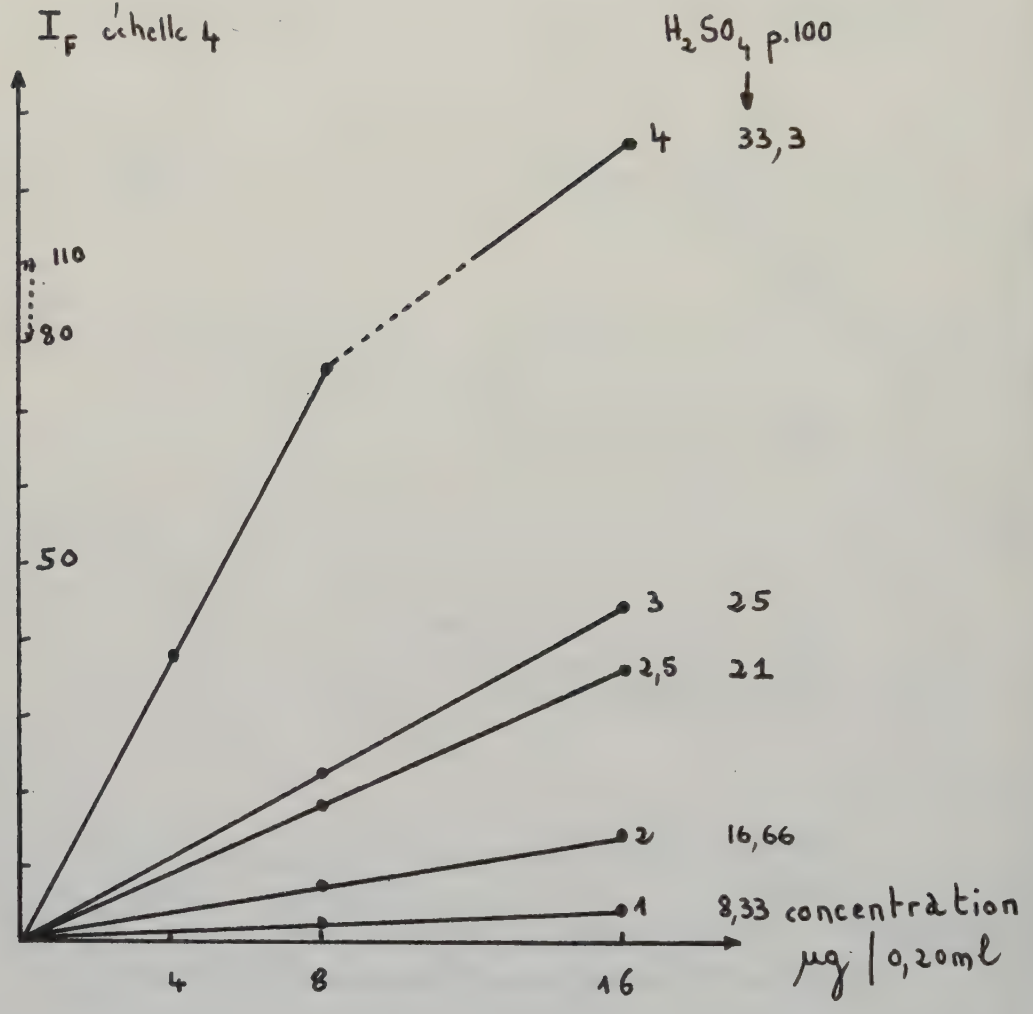
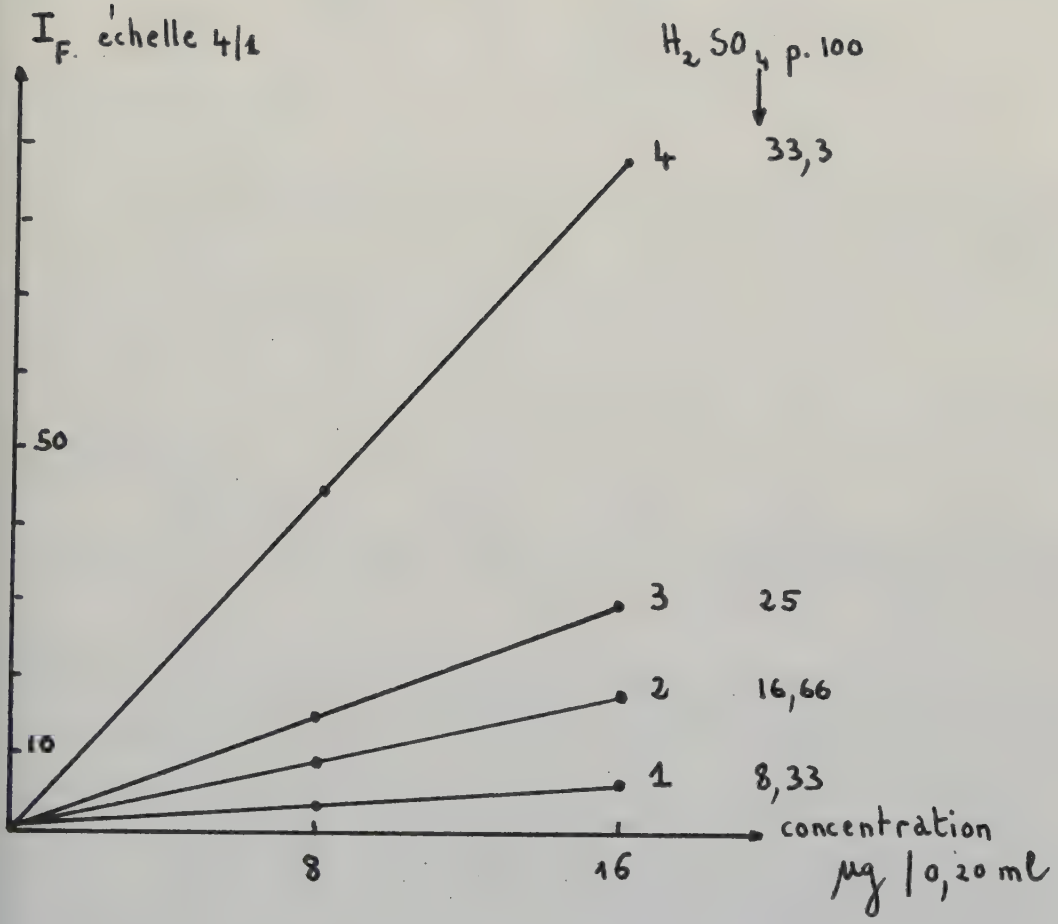


FIGURE N° 46 : Sensibilité en fonction de la concentration en acide sulfurique (mélange I).



IGURE N° 47 : Sensibilité en fonction de la concentration en acide sulfurique (mélange II).

(16,66 pour 100) et trois volumes (25 pour 100) d'acide sulfurique et des proportions variables d'anhydride acétique. La composition des différents mélanges réactionnels est résumée dans le tableau n°22.

- *sur le plan spectral :*

Il n'y a aucune modification du spectre d'excitation et du spectre d'émission.

- *sur le plan cinétique :*

. *Pour la série A* (figure 48) comportant 16,66 pour 100 d'acide sulfurique, plus la concentration en anhydride acétique augmente, plus la cinétique est rapide. Le maximum de fluorescence est atteint au bout de :

5 minutes pour les mélanges 1 et 2,

10 minutes pour le mélange 3,

15 minutes pour le mélange 4,

30 minutes pour le mélange 5.

. *Pour la série B* (figure 49), plus riche en acide sulfurique (25 pour 100), la cinétique est indépendante de la concentration en anhydride acétique. Pour tous les mélanges, le maximum de fluorescence est atteint dès la dixième minute.

. *Pour les deux séries* et plus spécialement pour la série A, la stabilité réactionnelle est inversement proportionnelle à la concentration en anhydride acétique.

- *Série A :* la réaction est instable pour les mélanges 1 et 2. La stabilité n'excède pas cinq minutes pour les mélanges 3 et 4. Elle est de quinze minutes pour le mélange 5 pauvre en anhydride acétique.

- *Série B :* la réaction est parfaitement stable pour tous les mélanges à l'exclusion du mélange 1' dont la fluorescence diminue d'environ 6 pour 100 par heure.

- *Sur le plan de la sensibilité :*

. *Pour la série A* (figure 50), l'influence de l'anhydride acétique sur l'intensité de la fluorescence est relativement faible : les mélanges 3 - 4 et 5 ont une sensibilité comparable, inférieure de 10 pour 100 à celle des mélanges 1 et 2.

TABLEAU N° 22 - Influence de la concentration en anhydride acétique : composition des mélanges réactionnels étudiés.

SERIE A	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
$H_2 SO_4$	2	2	2	2	2
Acide Acétique	2	4	6	7	8
Anhyd.Acétique	8	6	4	3	2
$\frac{\text{\% Anhyd. Acét.}}{\text{Ac.Acét.+Anhyd.Ac.}}$	80	60	40	30	20

SERIE B	*1'*	*2'*	*3'*	*4'*	*5'*
$H_2 SO_4$	3	3	3	3	3
Acide Acétique	2	3	4	5	6
Anhyd. Acétique	7	6	5	4	3
$\frac{\text{\% Anhyd. Acét.}}{\text{Ac.Acét.+Anhyd.Ac.}}$	77,77	66,66	55,55	44,44	33,33

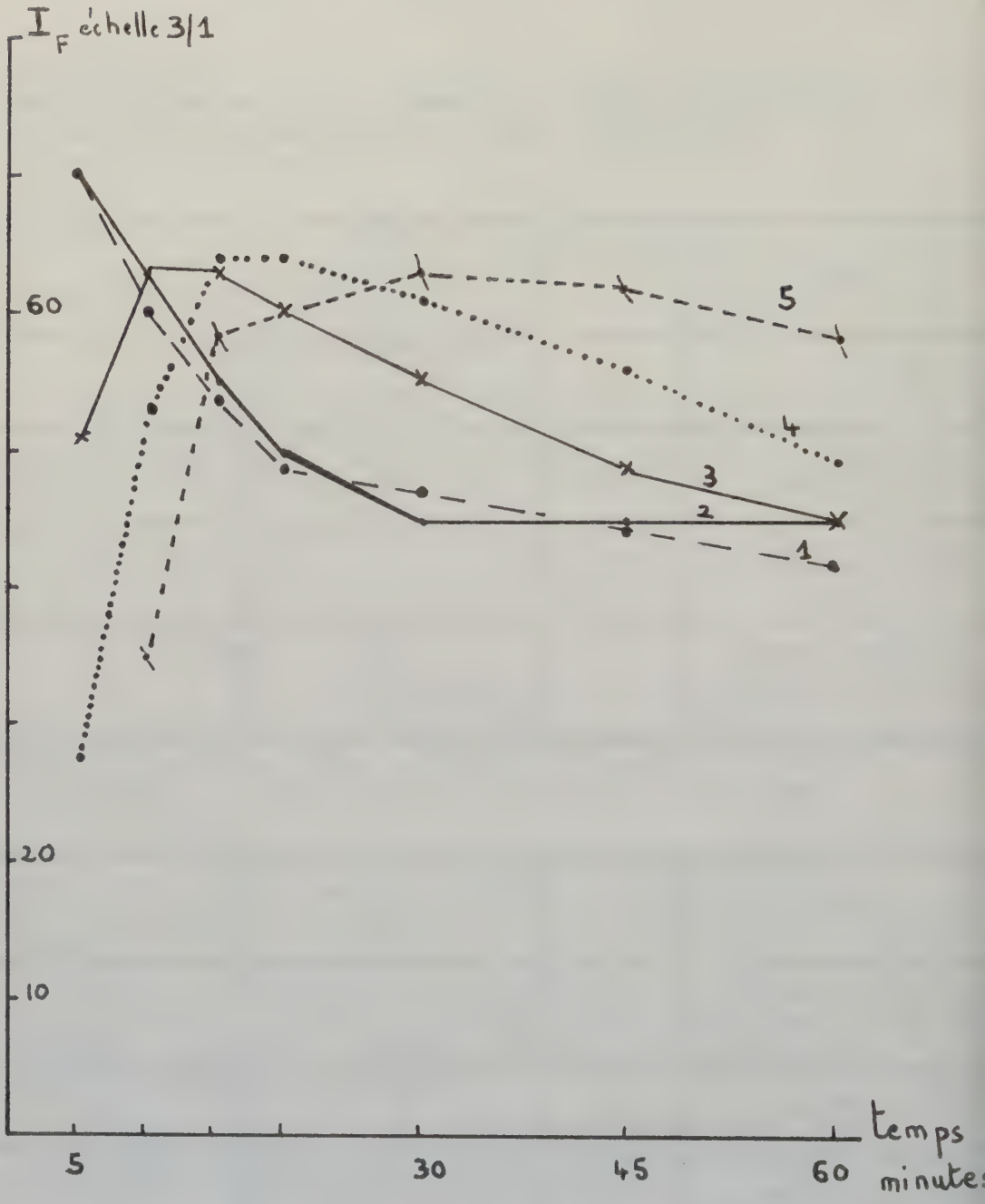


FIGURE N° 48 : Cinétique en fonction de la concentration en anhydride acétique (série A).

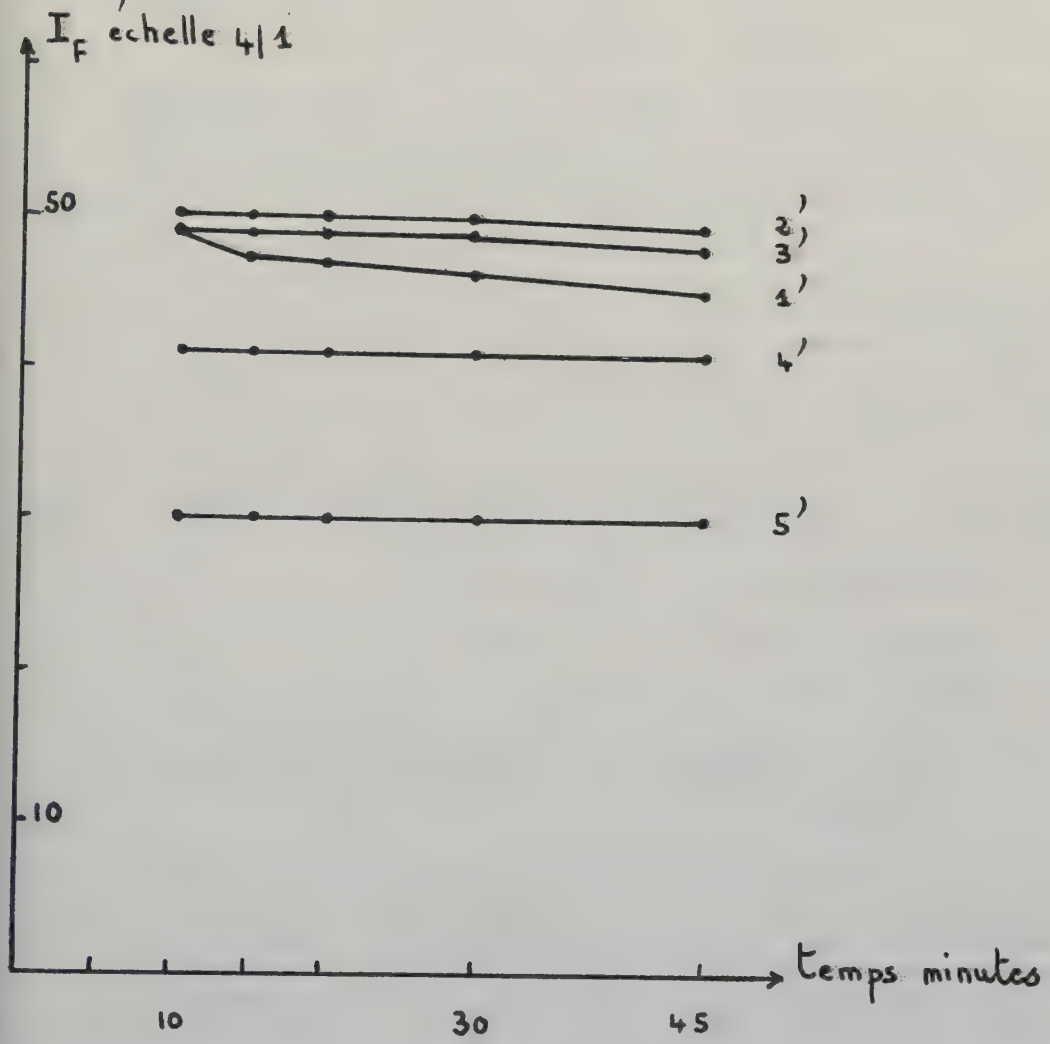


FIGURE N° 49 : Cinétique en fonction de la concentration en anhydride acétique (série B).

. *Pour la série B* (figure 51). Les mélanges 1'-2'-3' ont une sensibilité comparable alors que les mélanges 4' et surtout 5', moins riches en anhydride acétique, conduisent à une fluorescence nettement plus faible.

Remarque: La teneur en anhydride acétique joue un rôle sur l'intensité de la fluorescence du blanc réactif : en effet celle-ci lue par rapport à l'air augmente avec l'élévation de la teneur en anhydride acétique du mélange réactionnel.

Cette étude montre le rôle prépondérant de l'acide sulfurique tant sur le plan de la cinétique et de la stabilité réactionnelles que sur le plan de la sensibilité. Le mélange de FERRO initial présente l'inconvénient de développer une fluorescence fugace et de faible intensité. C'est la raison pour laquelle il nous a paru indispensable de définir pour la suite de notre expérimentation un mélange réactionnel conduisant à une réaction suffisamment intense et stable permettant des déterminations en série. Nous avons choisi le mélange B'_2 comportant :

- acide sulfurique 3 volumes,
- anhydride acétique 6 volumes,
- acide acétique 3 volumes.

2. *Etude comparative de la fluorescence cholestérol - Stérides.*

Le tableau n°23 résume la composition en acides gras des esters du cholestérol sérique selon différents auteurs (52, 57, 98, 142). La majeure partie de ces esters est représentée par le linoléate et l'oléate. Nous avons comparé les fluorescences développées par le cholestérol et ses principaux esters physiologiques : linoléate - oléate - palmitate - stéarate et linolénate. En tenant compte des poids moléculaires de chacun de ces composés, nous avons préparé des solutions chloroformiques renfermant 1 g de cholestérol.

- Sur le plan qualitatif :

L'allure spectrale et la cinétique sont identiques à celles du cholestérol.

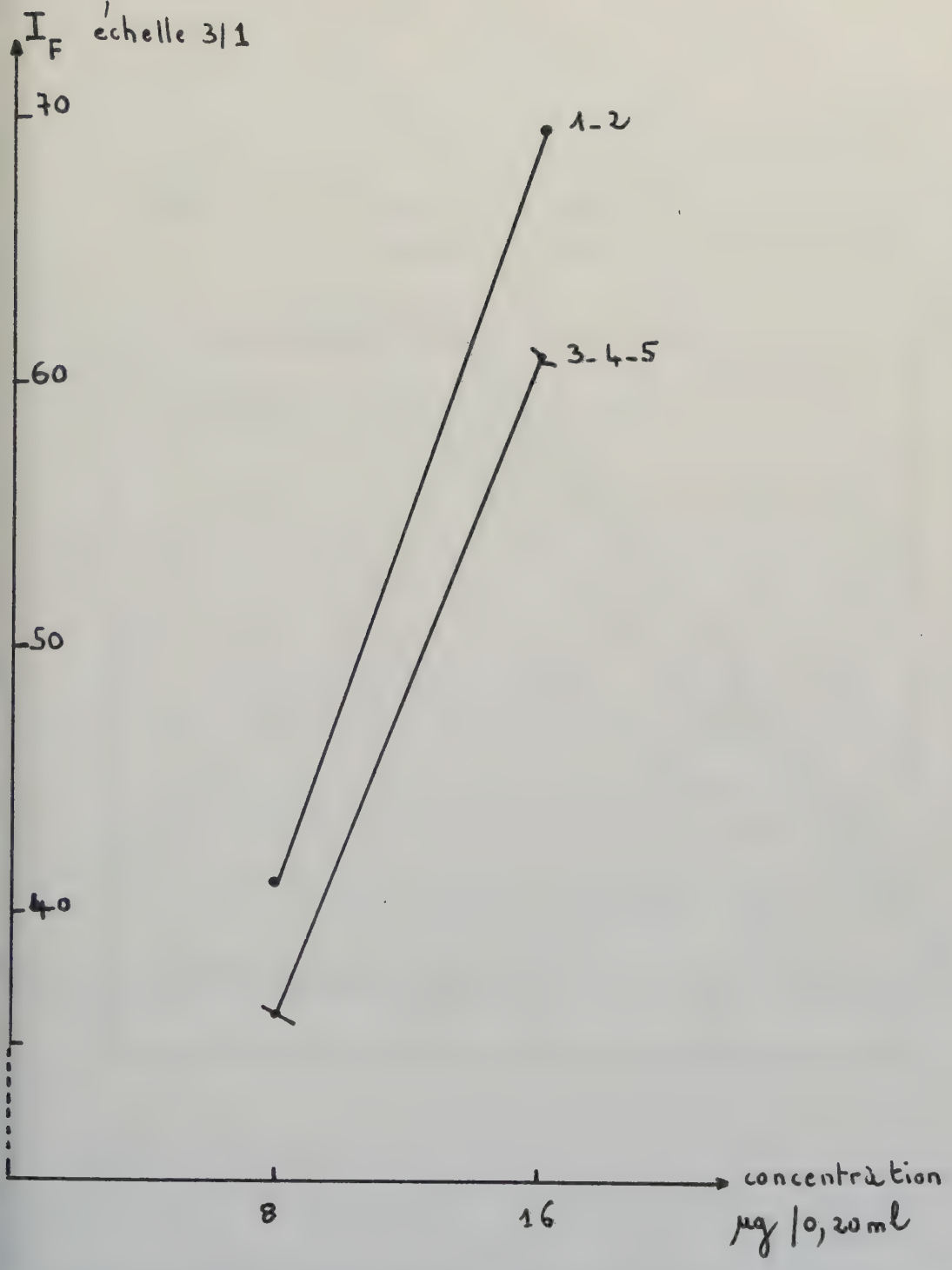


FIGURE N° 50 : Sensibilité en fonction de la concentration en anhydride acétique (série A).

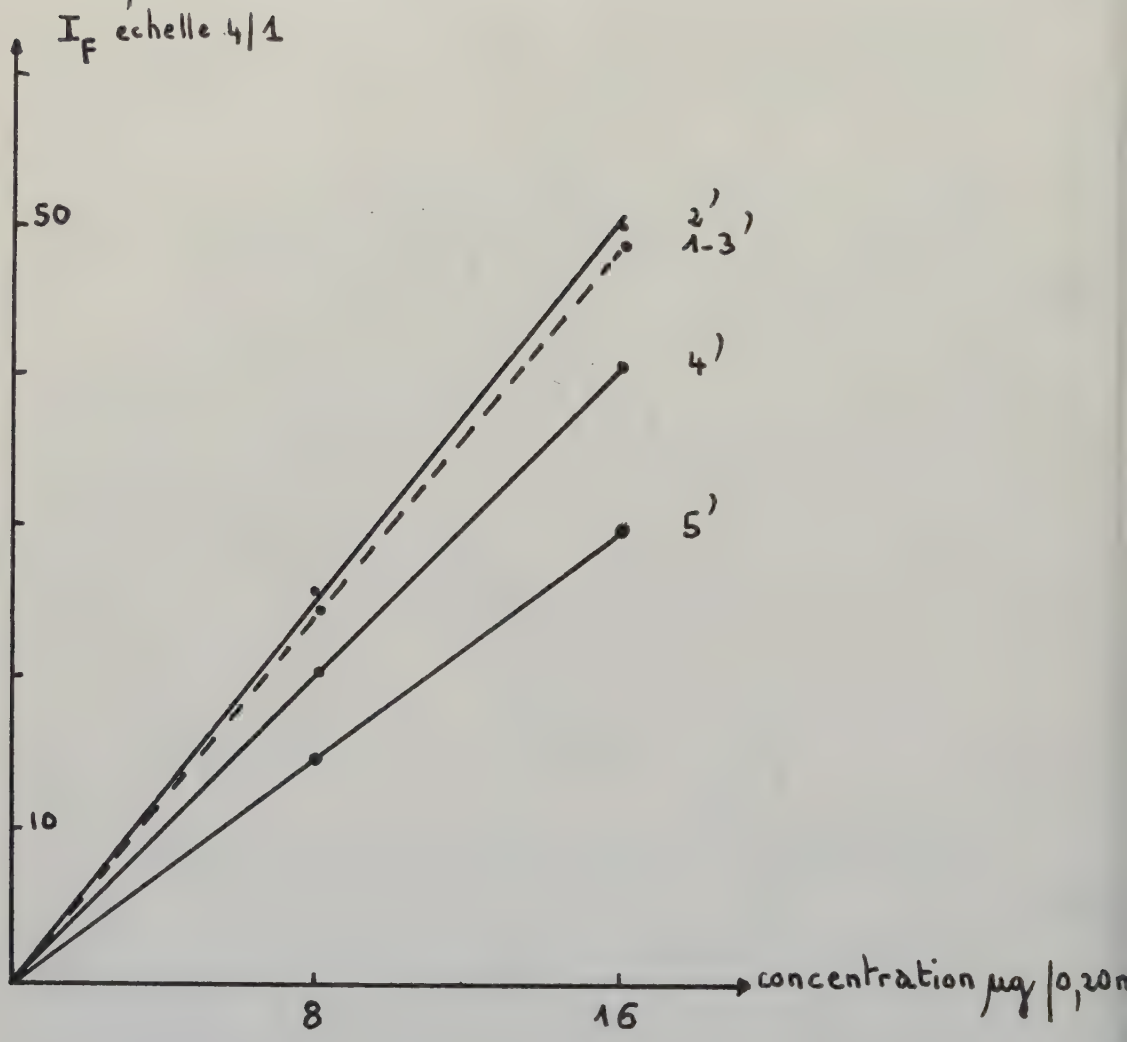


FIGURE N° 51 : Sensibilité en fonction de la concentration en anhydri
acétique (série B).

TABLEAU N° 23 - Composition en acides gras des esters du cholestérol sérique (52 - 57 - 98 - 142)

Acide myristique C_{14_0}.....	0,6 à 1,1 p. 100
Acide palmitique C_{16_0}	11,2 à 17 p. 100
Acide palmitoléïque C_{16_1}....	2,3 à 6,8 p. 100
Acide stéarique C_{18_0}.....	0,9 à 4 p. 100
Acide oléique C_{18_1}.....	18,9 à 22 p. 100
Acide linolénique C_{18_2}.....	47,1 à 58,8 p. 100
Acide linolénique C_{18_3}.....	0,4 à 0,9 p. 100
Acide arachidonique C_{20_4}.....	5 à 10 p. 100

- *Sur le plan quantitatif :*

Les résultats obtenus pour des concentrations égales à 8 µg et 16 µg dans 0,20 ml sont consignés dans le tableau suivant :

	Fluorescence	
	8 µg échelle 3/1	*16 µg échelle 3/0,5*
Cholestérol.....	98	200
Linoléate.....	100	195
Oléate.....	100	200
Palmitate.....	98	195
Stéarate.....	96	185
Linolénate.....	95	190

On constate que le cholestérol et ses esters réagissent de manière identique.

3. *Etude de la fluorescence en fonction de la concentration.*

- *Linéarité.*

Dans les conditions opératoires choisies (0,20ml de cholestérol dans 4 ml de mélange réactionnel), la réaction de Liebermann - Burchard détectée en fluorescence est linéaire jusqu'à 40 µg pour les deux mélanges étudiés FERRO classique et B'_2 (figures 52 et 53).

La sensibilité obtenue avec le mélange B'_2 est à peu près égale à 2,5 fois celle obtenue avec le mélange de FERRO (figure n°54).

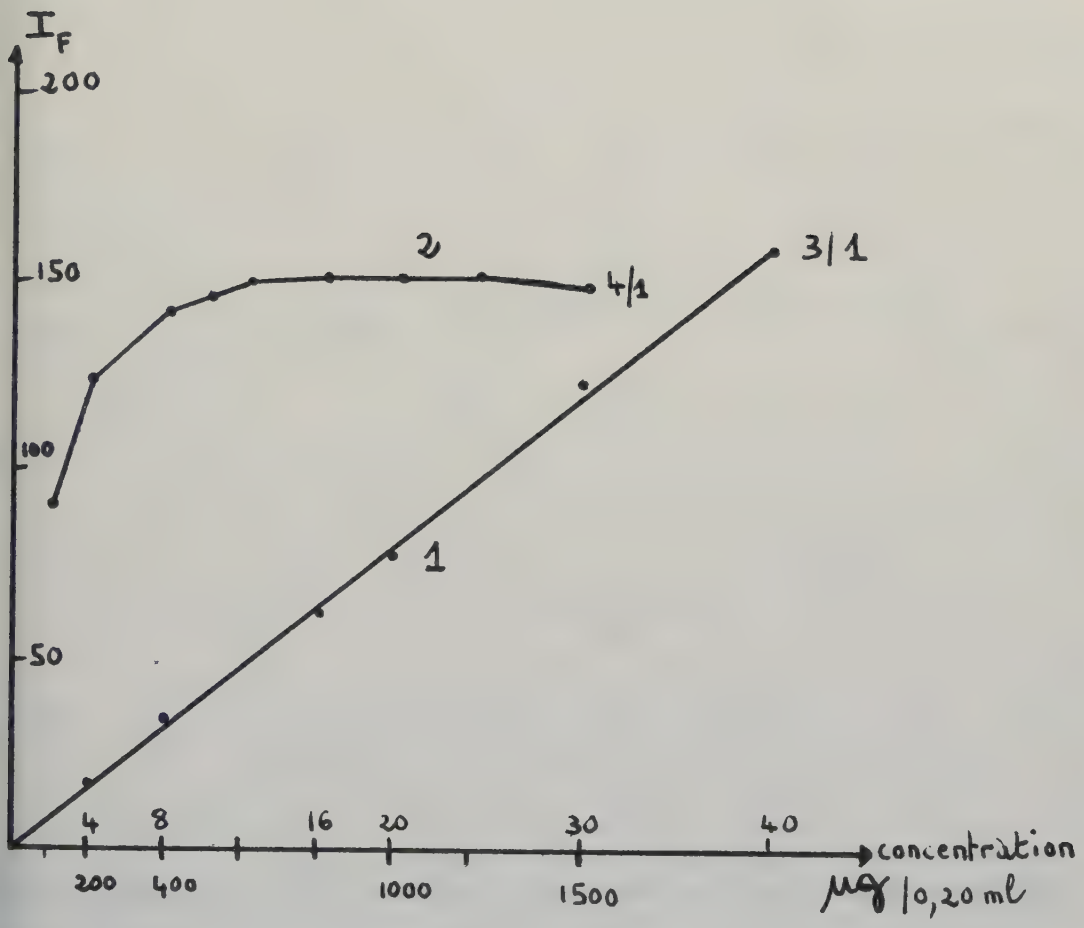


FIGURE N° 52 : Courbes de linéarité (1) et de quenching (2) dans le mélange de Ferro.

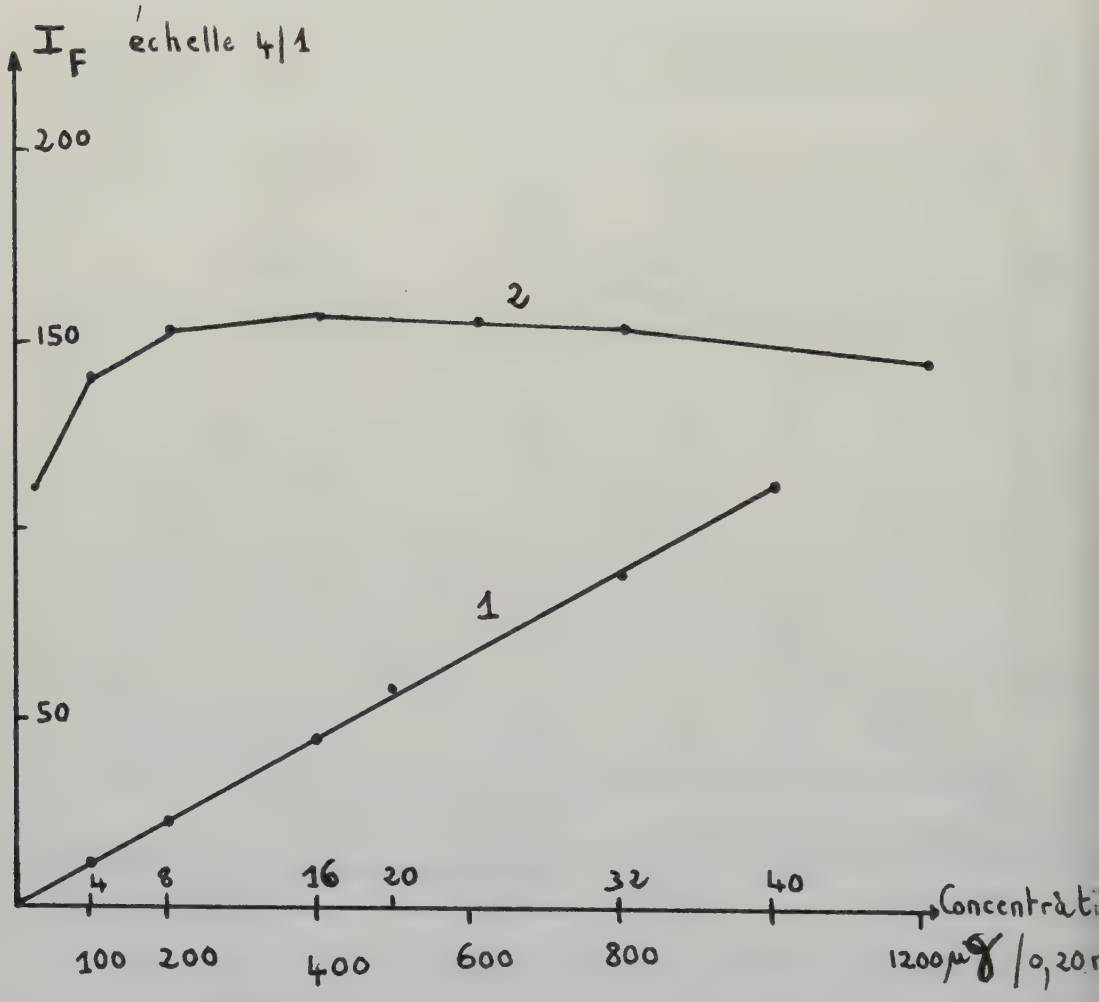


FIGURE N° 53 : Courbes de linéarité (1) et de quenching (2) dans le mélange B'_2.

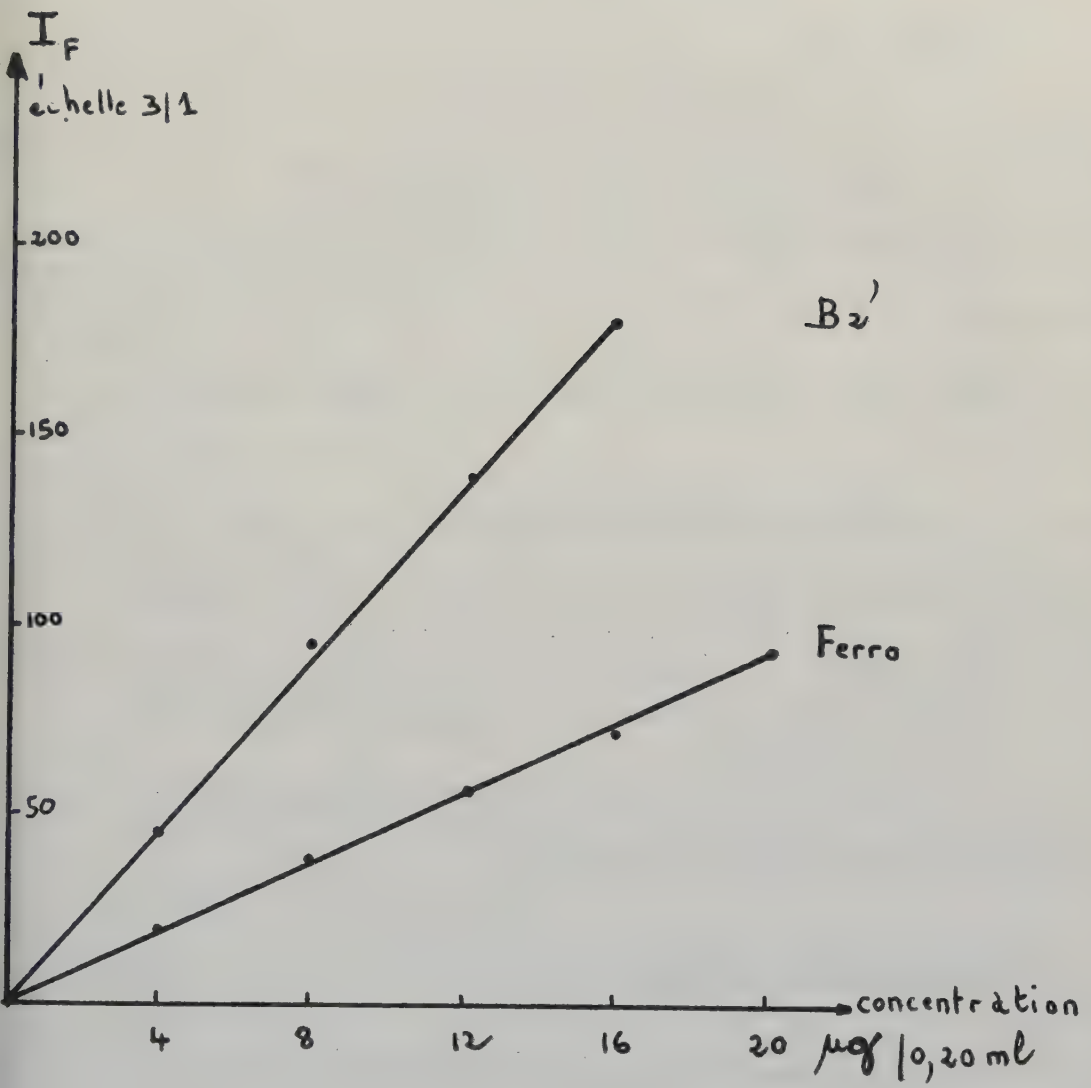


FIGURE N° 54 : Comparaison des sensibilités obtenues avec le mélange B_2 et le mélange de Ferro.

"Quenching".

L'inhibition de la fluorescence est obtenue pour des concentrations égales respectivement à :

- 1500 µg pour le mélange de FERRO (figure n°52),
- 600 µg pour le mélange B'_2 (figure n°53).

II. ETUDE ANALYTIQUE DES REACTIONS DE SALKOWSKI ET DE ZAK.

Nous avons envisagé cette étude :

- *d'une part en l'absence de catalyseur :* le mélange réactionnel est constitué d'acide sulfurique et d'un solvant, le plus classique étant l'acide acétique ;
- *d'autre part :* en présence d'un catalyseur selon le protocole de ZAK : au mélange réactionnel précédent on ajoute les ions ferriques.

Le chloroforme n'est pas miscible avec le mélange réactionnel, nous avons pour cette raison utilisé une solution isopropanolique de cholestérol.

A. REACTION DE SALKOWSKI.

Les mélanges réactionnels étudiés se différencient :

1.- par les proportions relatives d'acide sulfurique/solvant : le pourcentage d'acide sulfurique varie de 20 à 71,4 pour 100 ;

2.- par la nature du solvant : trois solvants ont été utilisés, l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et l'éthanol.

La composition des divers mélanges réactionnels est consignée dans le tableau n°24 :

Tableau n°24 : Composition des mélanges réactionnels étudiés dans la réaction de Salkowski.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1) Acide sulfurique ml.....	5	3	2	2	2	2	2	2
2) Solvant ml : A. Acide acétique ou, B. Acétate d'éthyle ou, C. Ethanol	2	2	2	3	4	5	6	8
Acide sulfurique pour 100 dans le mélange réactionnel	71,4	60	50	40	33,33	28,57	25	20

a) Aspect qualitatif.

1. Allure spectrale.

Quel que soit le mélange réactionnel étudié, l'allure spectrale est identique.

- Le spectre d'excitation présente trois pics aigus respectivement situés suivant le type d'appareil utilisé à:

- 448 nm,
- 465 nm avec prédominance du pic à 465 nm,
- 470 nm,

pour le J Y_3 (fig. 55).

- 455, 475 et 485 nm avec prédominance du pic à 475 nm,

pour le Perkin Elmer MPF_3.

- Le spectre d'émission présente un seul pic situé à:

- 520 nm pour le J Y_3 (figure n°55),
- 520 nm pour le Perkin Elmer MPF_3.

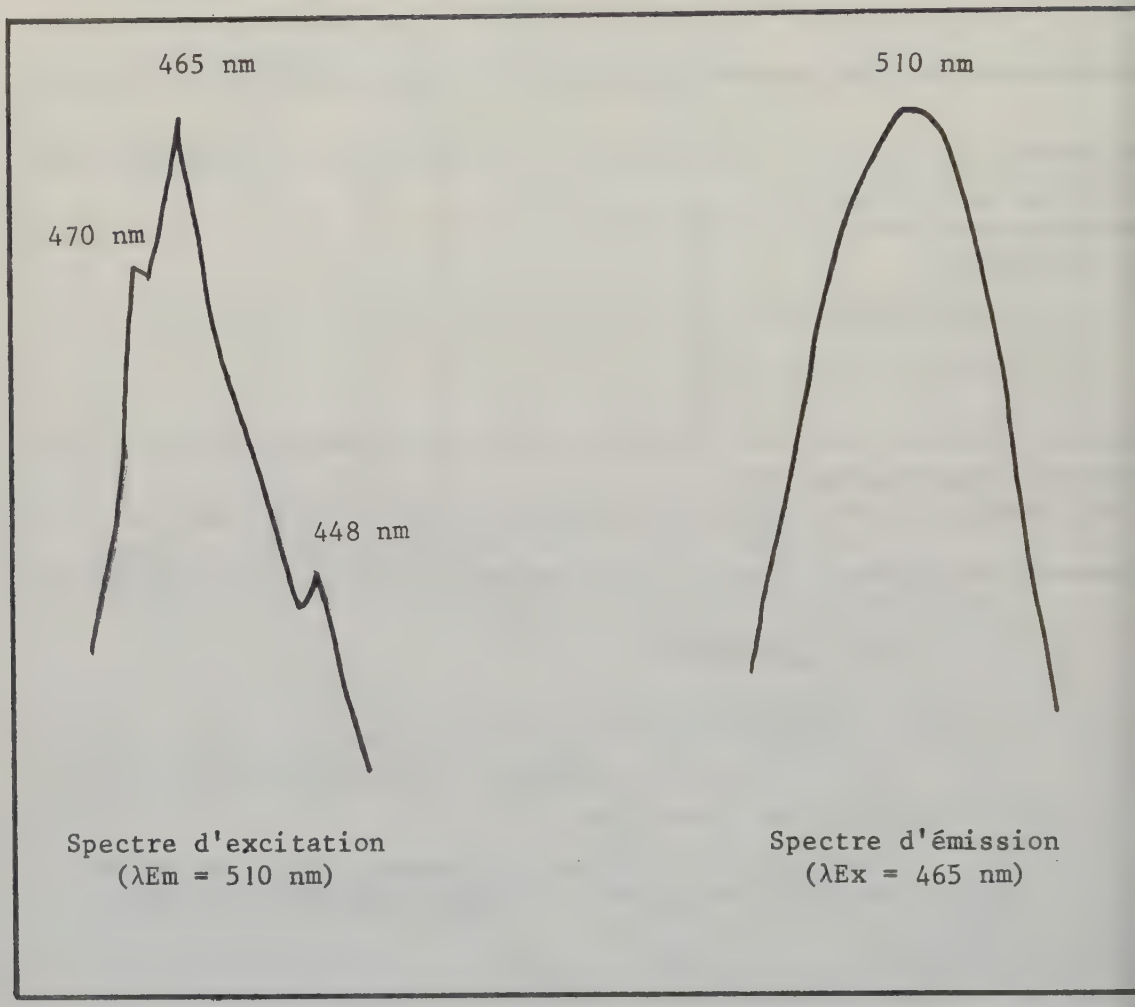


FIGURE N° 55 : Spectres d'excitation et d'émission du cholestérol dans la réaction de Salkowski (JY_3)

- Avec le spectrofluorescimètre Sebia CGA 3000 avec lequel est réalisé l'ensemble de ce travail, on obtient une λ Excitation à 470 nm et une λ Emission à 510 nm.

2. Cinétique.

a) A la température ordinaire de 24°C.

Les cinétiques obtenues avec les différents mélanges pour chaque solvant sont schématisées dans les figures 56, 58 et 60.

1.- pour les concentrations d'acide sulfurique comprises entre 50 et 71,4 pour 100, la cinétique est très lente, le développement de la fluorescence se poursuit au-delà de deux heures ;

2.- pour des concentrations comprises entre 25 et 40 pour 100 :

. avec l'acide acétique l'intensité maximà est atteinte au bout de 1 h, 1 h.15 et se maintient pendant 30 minutes au moins,

. avec l'acétate d'éthyle et l'éthanol elle n'est atteinte qu'au bout de 1 h.30.

2.- pour des concentrations inférieures à 25 pour 100 : la cinétique redevient très lente et rejoint celle du cas n°1.

b) A 60°C.

Pour des concentrations d'acide sulfurique comprises entre 25 et 40 pour 100 une température de 60° pendant 20 minutes :

- ne modifie pas les caractéristiques spectrales,
- accélère la cinétique : l'intensité maxima est atteinte immédiatement.

b) Aspect quantitatif.

1. Choix d'un mélange réactionnel.

Les figures 57, 59 et 61 représentent les intensités obtenues avec les différents mélanges réactionnels pour une concentration de 4 µg de cholestérol dans la prise d'essai (0,10 ml).

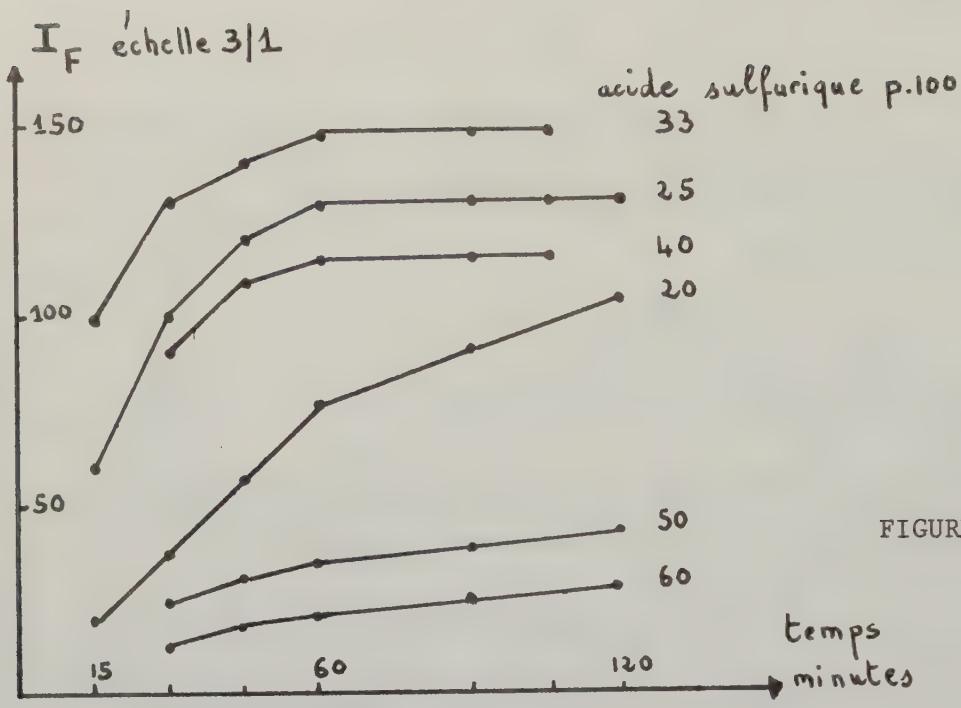


FIGURE 56

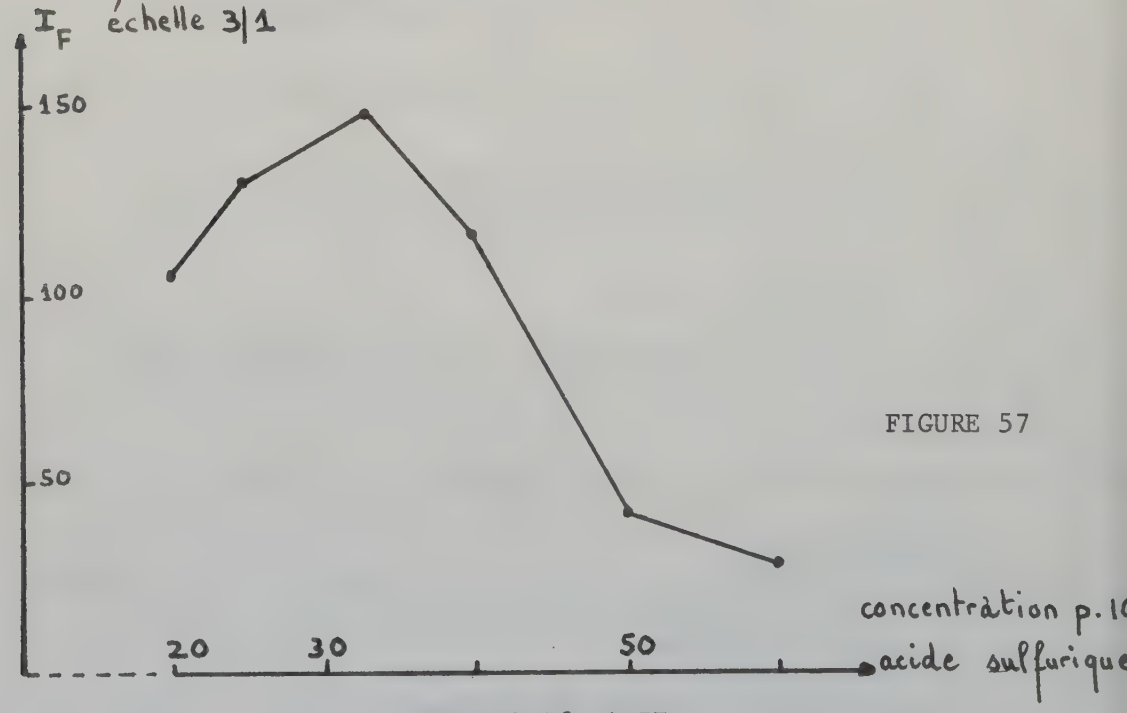


FIGURE 57

FIGURES 56 et 57

: Influence de la concentration en acide sulfurique sur la cinétique (fig. 56) et sur la sensibilité (fig. 57). (solvant : acide acétique).

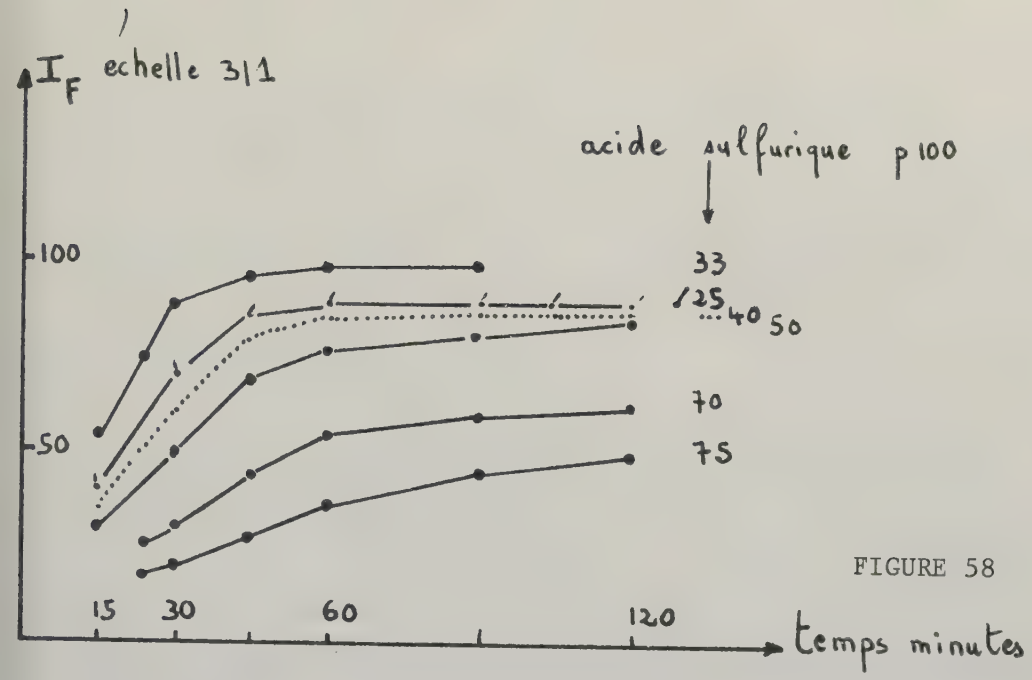


FIGURE 58

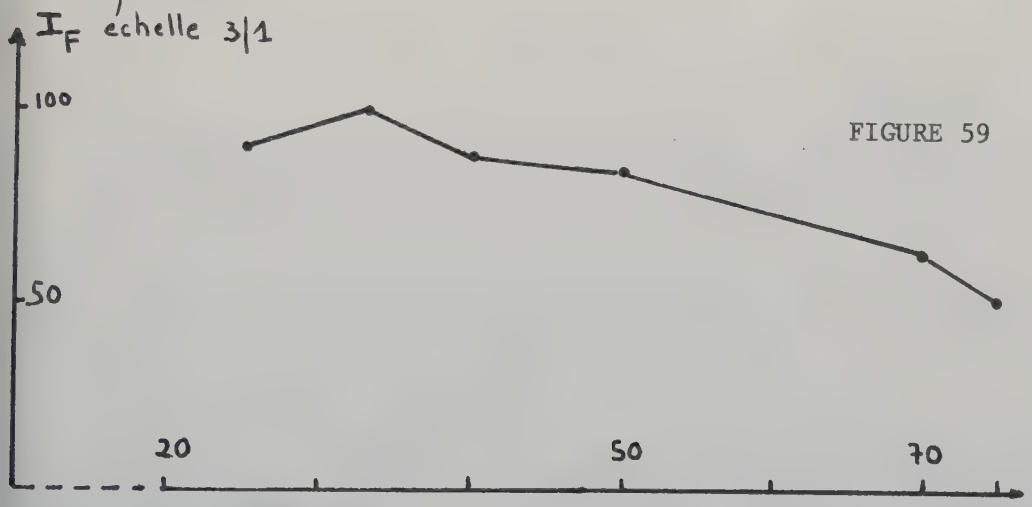


FIGURE 59

FIGURES 58 et 59 : Influence de la concentration en acide sulfurique sur la cinétique (fig. 58) et sur la sensibilité (fig. 59). (solvant : acétate d'éthyle).

FIGURE 60

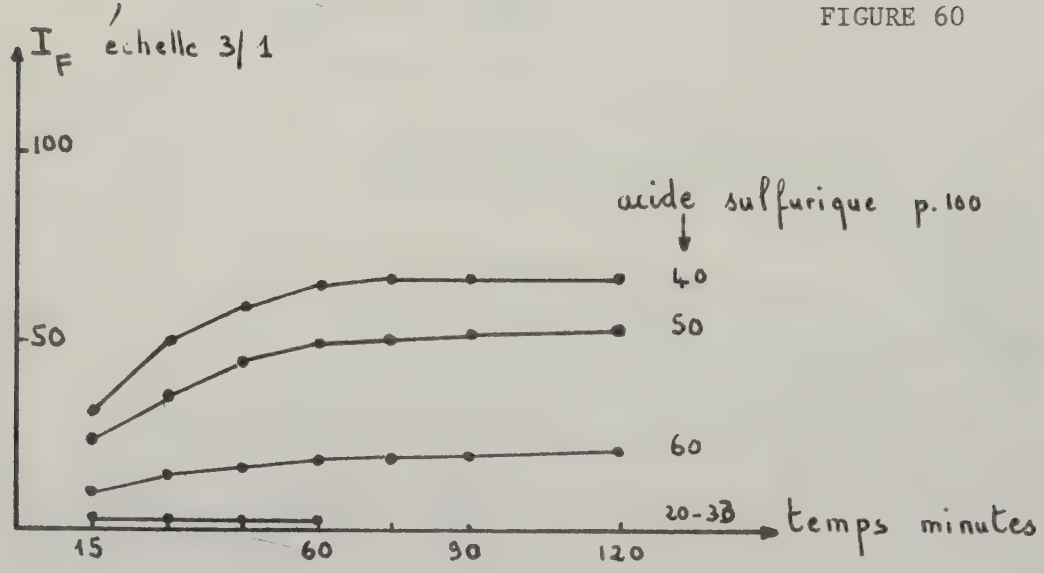
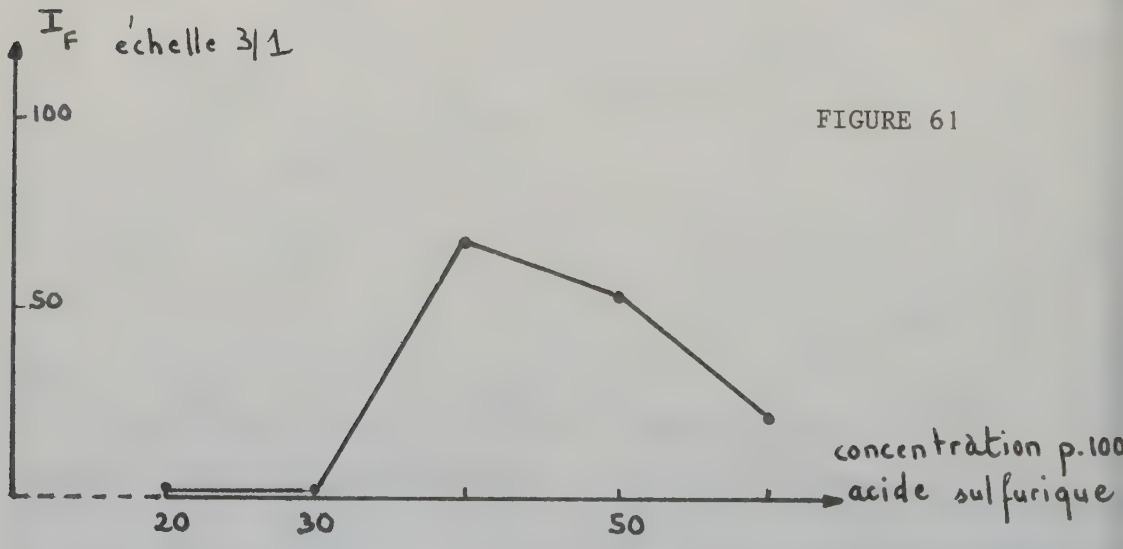


FIGURE 61



FIGURES 60 et 61

: Influence de la concentration en acide sulfurique sur la cinétique (fig. 60) et sur la sensibilité (fig. 61). (solvant : éthanol).

On constate que :

a) pour un même solvant,

la sensibilité varie en fonction de la concentration d'acide sulfurique : les différents points se répartissent sur une courbe dont le maximum est situé :

- à une concentration de 33,33 pour 100 pour l'acide acétique et l'acétate d'éthyle,
- à une concentration de 40 pour 100 pour l'éthanol. On remarque en outre qu'avec ce dernier solvant on n'observe plus de fluorescence pour des concentrations en acide sulfurique inférieures à 40 pour 100.

b) la sensibilité varie en fonction de la nature du solvant.

La fluorescence fournie par l'acide acétique est plus importante que celles fournies par l'acétate d'éthyle et l'éthanol.

c) pour des concentrations d'acide sulfurique,

comprises entre 25 et 40 pour 100, la température n'exerce aucune influence sur la sensibilité, l'intensité obtenue après un chauffage de 20' à 60°C est la même que celle obtenue au bout de 1 heure à la température ordinaire.

Compte tenu des résultats fournis par cette étude nous avons abandonné :

- l'éthanol - il développe en effet des réactions de trop faible intensité ;
- l'acétate d'éthyle - les témoins réactifs possèdent une fluorescence de base assez importante. Pour la suite de notre expérimentation nous avons retenu le mélange réactionnel A_5 comportant deux volumes d'acide sulfurique (33 pour 100) et quatre volumes d'acide acétique : en effet ce mélange développe des réactions très sensibles et très stables.

2. *Etude comparative de la fluorescence cholestérol - Stérides.*

Le cholestérol et ses esters physiologiques en solutions isopropanoliques ont donné les résultats suivants pour une concentration de 2 µg de cholestérol dans la prise d'essai :

	Température ordinaire Fluorescence échelle 3/1	*20' à 60°C Fluorescence échelle 3/1*
Cholestérol.....	85	88
Linoléate.....	82	88
Palmitate.....	86	87
Oléate.....	86	85
Stéarate.....	40	75
Linolénate.....	75	85

- à la température ordinaire :

Tous les esters réagissent comme le cholestérol à l'exception du linolénate (moins 12 pour 100) et du stéarate (moins 56 pour 100).

- à 60°C pendant 20 minutes :

Le linolénate rejoint les autres esters, seul le stéarate donne une intensité plus faible mais la différence est beaucoup moins accusée (moins 17 pour 100) qu'à la température ordinaire.

3. *Etude de la fluorescence en fonction de la concentration (figure n°62).*

- Linéarité :

La fluorescence développée dans ce mélange réactionnel est linéaire jusqu'à 10 µg de cholestérol dans la prise d'essai (0,10 ml).

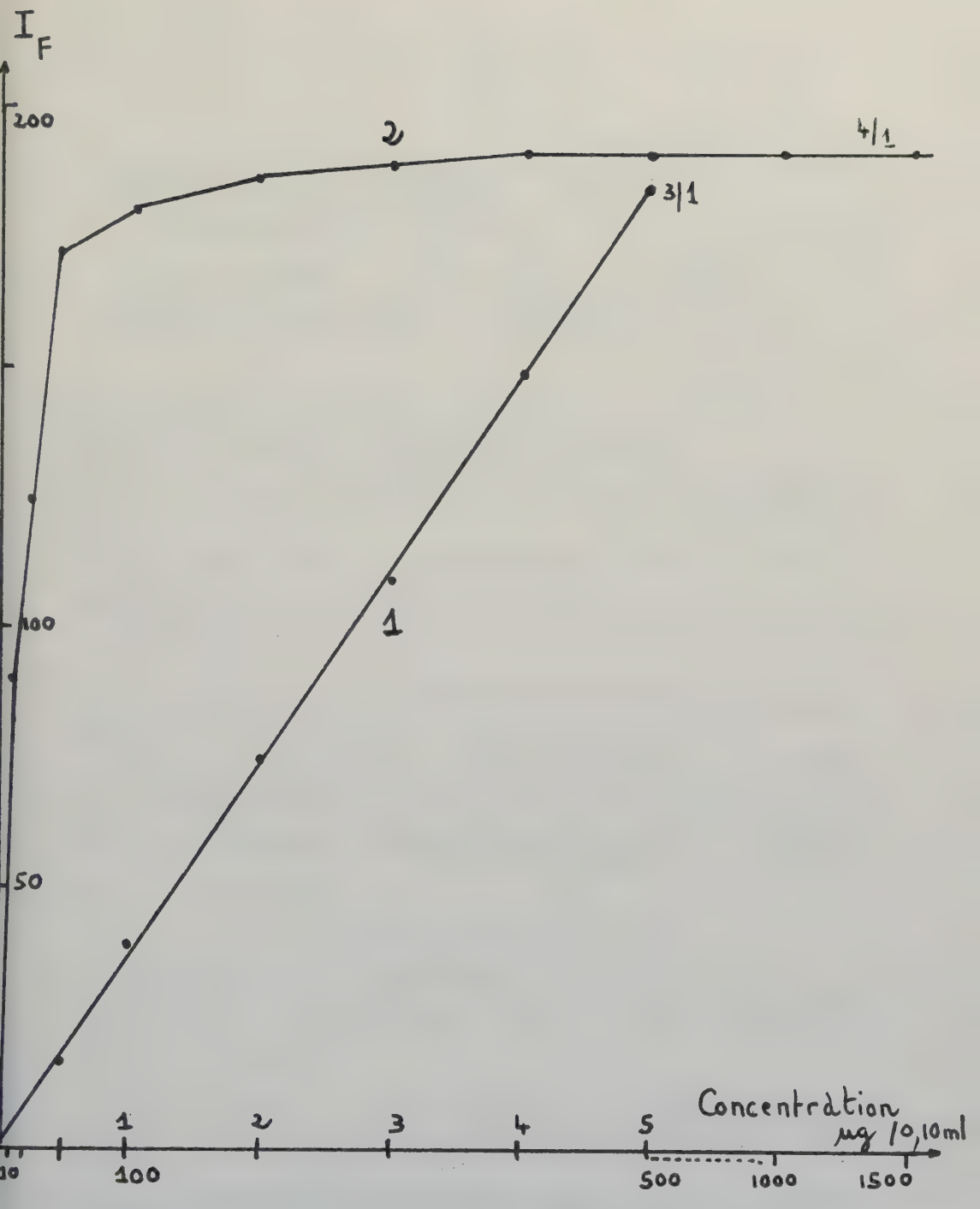


FIGURE 62 : Courbes de linéarité (1) et de quenching (2) dans la réactio de Salkowski (mélange A_5).

- *Quenching :*

Si on augmente la concentration on n'observe pas de quenching. On constate seulement qu'à partir de 400 µg dans la prise d'essai, l'intensité de la fluorescence atteint un plateau.
Pour des concentrations supérieures à 800 µg il apparaît, au bout de 20 à 30 minutes, un trouble dans le mélange réactionnel.

Parallèlement à cette étude en fluorescence, nous avons réalisé une étude en colorimétrie sur les mêmes mélanges réactionnels en utilisant une solution isopropanolique de cholestérol à 8 g/l.

. *Sur le plan spectral :*

Le spectre est caractérisé par trois maximums d'absorption respectivement situés à 410 - 435 et 485 nm.

. *Sur le plan cinétique :*

La vitesse de réaction est fonction de la concentration en acide sulfurique : à l'exception des mélanges 4 et 5 renfermant respectivement 40 et 33,33 pour 100 d'acide sulfurique, les cinétiques sont très lentes. Le comportement de ces deux derniers mélanges est identique en colorimétrie et en fluorométrie.

. *Sur le plan de la sensibilité :*

On retrouve le maximum d'intensité pour une concentration égale à 33,33 pour 100 pour l'acide acétique et l'acétate d'éthyle et de 40 pour 100 pour l'éthanol.

B. REACTION DE ZAK.

- On ajoute au mélange réactionnel précédent constitué d'acide sulfurique et d'un solvant, des ions ferriques.

- Nous avons étudié au début de notre travail le mélange de ZAK classique comportant :

  . acide sulfurique 2 volumes,

  . acide acétique 3 volumes,

  . perchlorure de fer 6 H_2O 500 mg/l.

1. Allure spectrale - Influence de la température.

- A la température ordinaire de 24°C :

. Le spectre d'excitation est caractérisé par trois pics aigus respectivement situés à :

- 448, 468 et 478 nm avec prédominance du pic à 468 nm pour le JY_3 (fig. 63) ;
- 455, 470 et 485 nm avec prédominance du pic à 470 nm pour Perkin Elmer MPF_3.

Avec le spectrofluorescimètre Sebia CGA 3000, nous avons trouvé une λ émission = 470 nm.

. Le spectre d'émission présente un seul pic situé à 505 nm quel que soit le type d'appareil utilisé.

- A chaud à une température de 60°C : (fig. 64)

On obtient :

une λ Excitation = 525 nm,

une λ Emission = 565 nm.

2. Sensibilité.

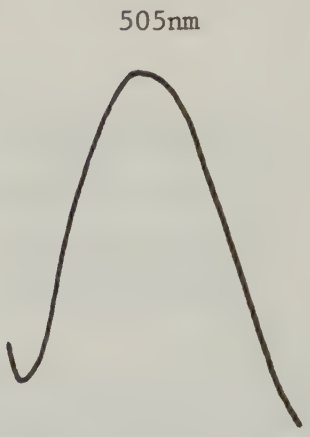
La réaction développée à chaud est beaucoup plus sensible qu'à la température ordinaire.

Ces résultats nous conduisent à étudier la réaction de Zak en fluorescence à la température ordinaire (réaction de Zak I) et à chaud (réaction de Zak II).

Pour chacune de ces réactions nous envisagerons successivement :

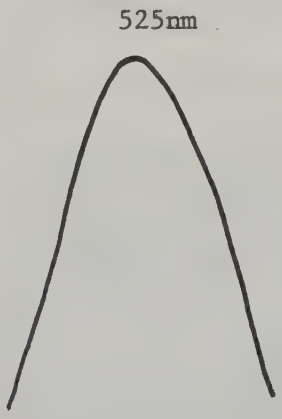
Fig. 63

Spectre d'excitation
(λEm = 505 nm)

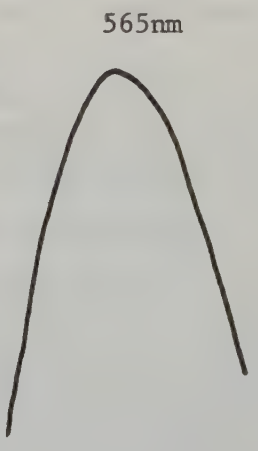


Spectre d'émission
(λEx = 470 nm)

Fig. 64



Spectre d'excitation
(λEm = 565 nm)



Spectre d'émission
(λEx = 525 nm)

SPECTRES D'EXCITATION ET D'EMISSION DU CHOLESTEROL
DANS LA REACTION DE ZAK (JY_3)

FIGURE N° 63 - A la température ordinaire (ZAK I)

FIGURE N° 64 - A chaud (ZAK II)

1.- l'influence des éléments de la réaction sur le plan cinétique et sur le plan de la sensibilité ;

2.- la fluorescence comparée du cholestérol et des stérides ;

3.- la fluorescence en fonction de la concentration en cholestérol.

I. Réaction de Zak I à la température ordinaire.

A. Influence des éléments de la réaction : choix d'un mélange réactionnel.

1. Influence de la concentration en acide sulfurique.

Différents mélanges réactionnels contenant une quantité fixe d'ion ferrique (250 mg/l) et des proportions variables d'acide sulfurique ont été étudiés. Leur composition est résumée dans le tableau n°25.

Tableau n°25 : Composition des mélanges réactionnels étudiés dans la réaction de Zak I.

Mélanges	1	2	3	4	5
Acide sulfurique (volume)	4	3	2,5	2	2
Acide acétique (volume)	2	2	2	2	3
Perchlorure de fer (mg/l)	250	250	250	250	250
Acide sulfurique pour 100 dans le mélange réactionnel	66,6	60	55	55	40

. Sur le plan spectral :

On observe toujours la même allure spectrale quelle que soit la concentration d'acide sulfurique.

. *Sur le plan cinétique :*

A l'exception du mélange 5 et pour les raisons exposées précédemment, les lectures ne peuvent pas être effectuées avant 25 à 30 minutes.

Les cinétiques obtenues avec les cinq mélanges pour une concentration de 0,4 µg dans la prise d'essai sont schématisées dans la figure n°65.

On constate que la vitesse de réaction est d'autant plus rapide que la concentration en acide sulfurique est faible. Alors que les cinétiques des mélanges 1 et 2 sont très lentes, le maximum d'intensité est atteint :

- au bout d'environ une heure pour le mélange 3 et se maintient pendant 30 minutes ;
- au bout de 20 et 30 minutes respectivement pour les mélanges 4 et 5. La réaction est très instable pour le mélange 5, pour le mélange 4 la stabilité n'excède pas 10 minutes.

. *Sur le plan de la sensibilité (fig. n°66) :*

La sensibilité varie en fonction de la concentration : l'intensité de la fluorescence est maxima pour une concentration égale à 50 % d'acide sulfurique.

2. Influence de la concentration en ions ferriques.

Pour les mélanges 2 - 3 et 4, nous avons fait varier la concentration en perchlorure de fer de 125 à 500 mg par litre dans le mélange réactionnel final ce qui correspond pour 5 ml de mélange réactionnel à des concentrations comprises entre 0,625 et 2,5 mg.

Les résultats obtenus sont schématisés dans les figures 67, 68 et 69.

L'ion ferrique influence :

. *d'une part la cinétique et la stabilité réactionnelles :*

La vitesse de réaction augmente de manière proportionnelle à la concentration en Fe^{+++}, au contraire plus la teneur en Fe^{+++} est faible, plus la stabilité de la fluorescence est grande.

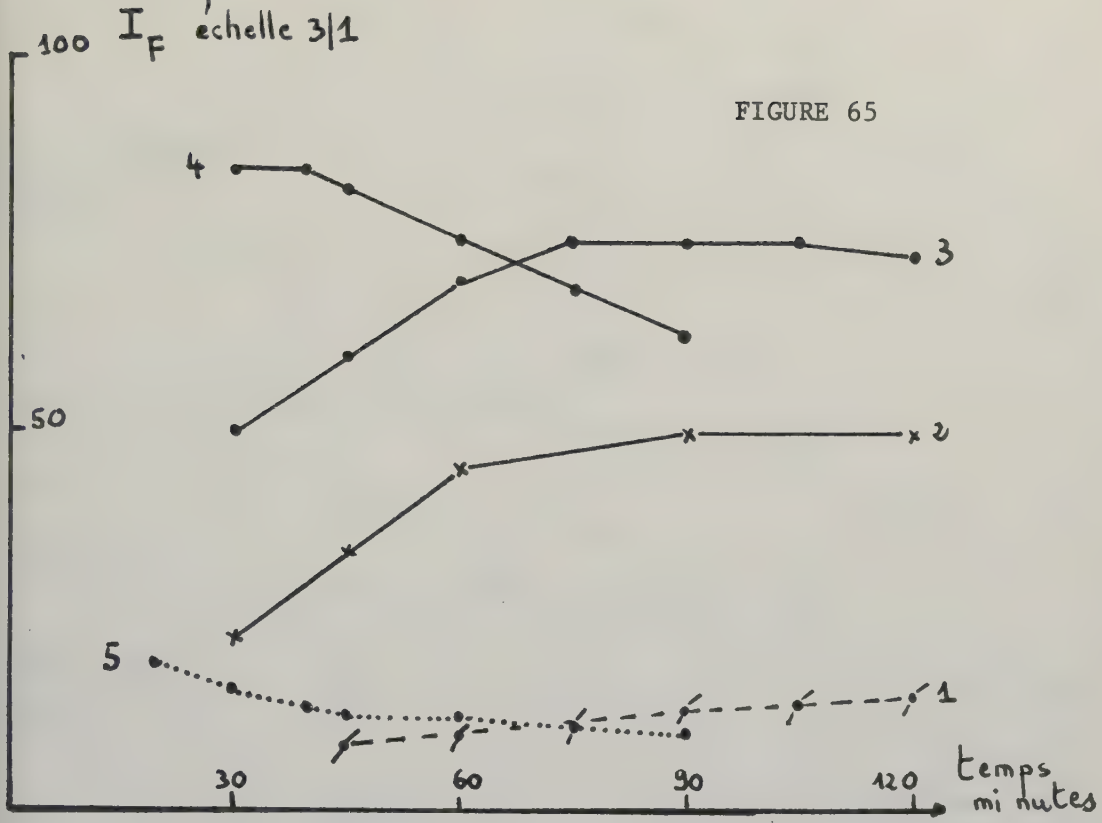


FIGURE 65

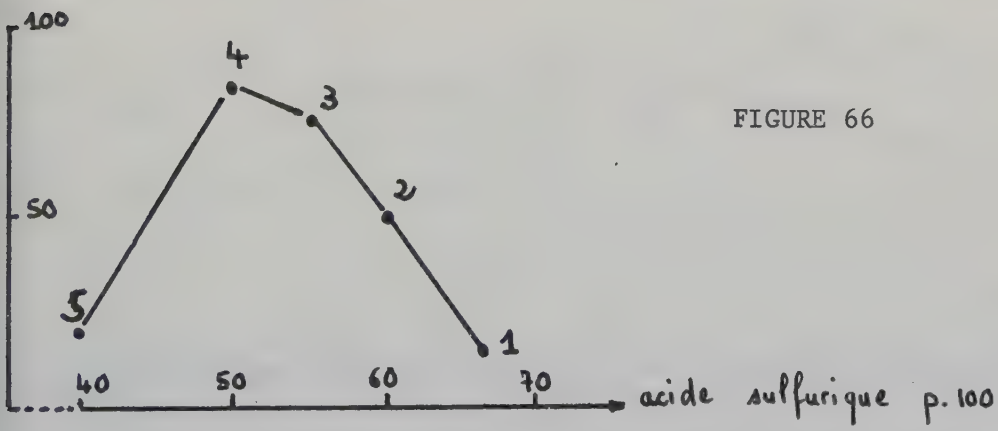


FIGURE 66

FIGURES N° 65 et 66 : Influence de la concentration en acide sulfurique sur la cinétique (Fig. 65) et sur la sensibilité (Fig. 66).

FIGURE 67

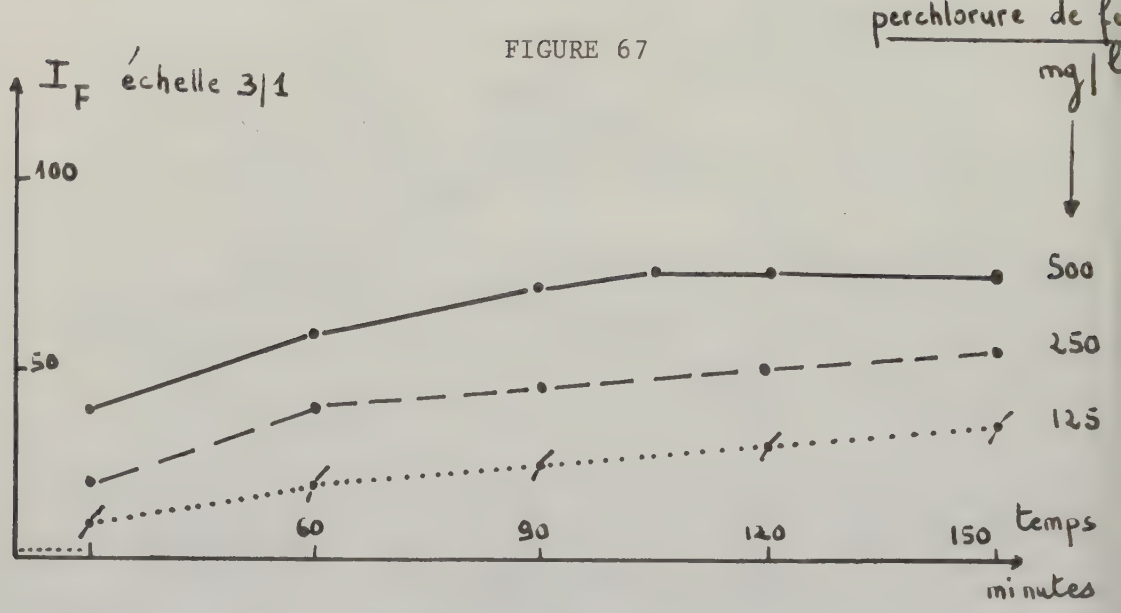
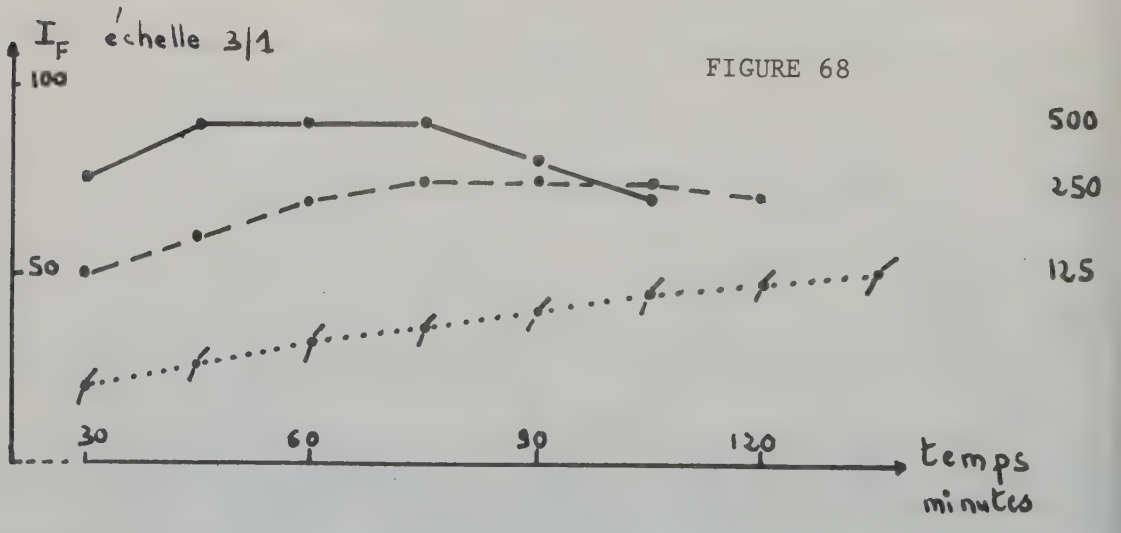
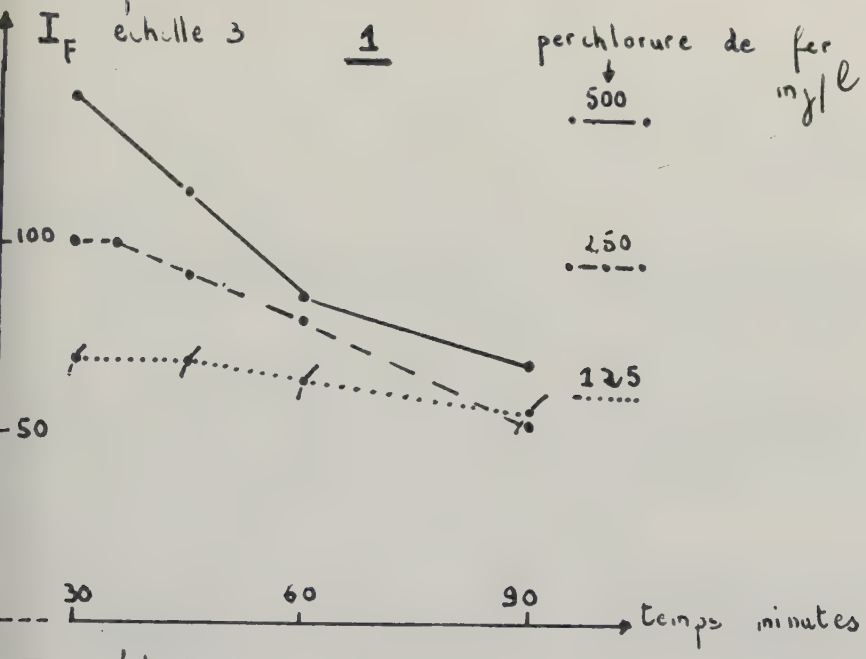


FIGURE 68



FIGURES N° 67 et 68 : Influence de la concentration en ions ferriques sur la cinétique (Fig. 67 : mélange n° 2 ; Fig. 68 : mélange n° 3).



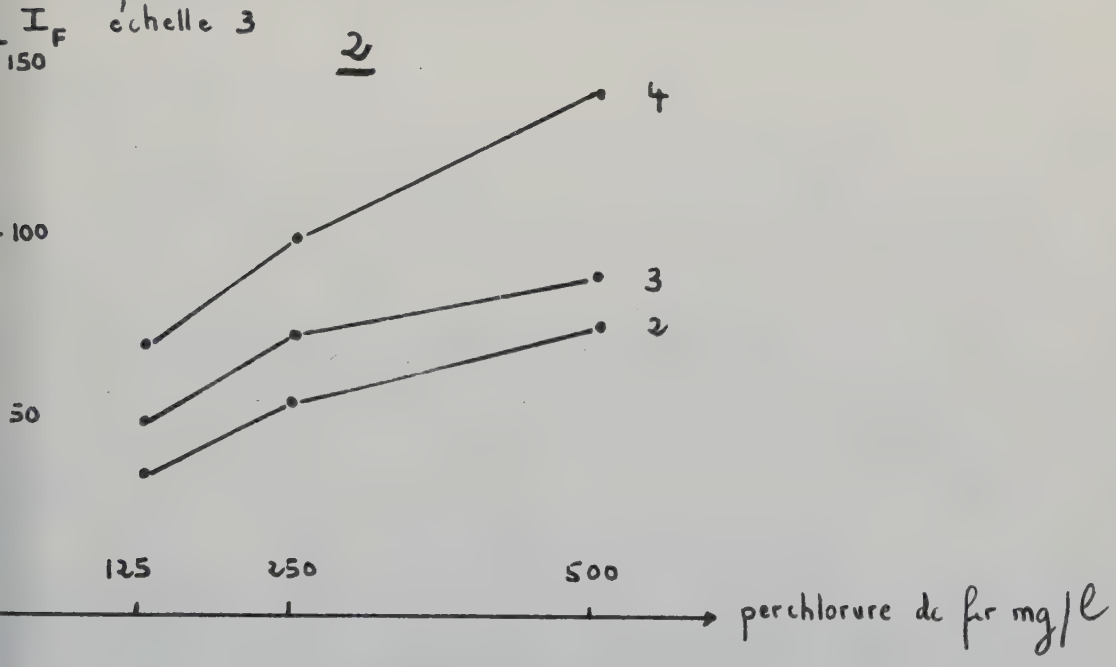


FIGURE N° 69

: Influence de la concentration en ions ferriques sur la cinétique dans le mélange n° 4 (1) et sur la sensibilité dans les mélanges 2, 3 et 4 (2).

Pour le mélange 3 par exemple :

- une concentration de 125 mg/l conduit à une cinétique très lente qui se poursuit au-delà de 2 heures ;
- pour une concentration de 250 mg/l, l'intensité maxima est atteinte au bout de 75 minutes et se maintient pendant au moins 30 minutes, puis elle diminue très lentement de 10 pour 100 en 30 minutes ;
- pour une concentration de 500 mg/l, la cinétique est plus rapide, l'intensité maxima est atteinte au bout de 45 minutes, se maintient pendant 30 minutes, puis diminue de façon très nette de 20 pour 100 en 30 minutes.

. d'autre part l'intensité de la fluorescence :

Plus la concentration en ions ferriques augmente, plus la sensibilité est importante. Celle-ci augmente de 40 pour 100 en moyenne lorsqu'on double la concentration.

3. Influence de l'anion lié à l'ion ferrique.

Nous avons comparé les deux sels ferriques les plus couramment utilisés : le perchlorure et le perchlorate en opérant à deux concentrations équivalentes à 250 et 500 mg/l en perchlorure.

On constate (figure 70 et 71) que si sur le plan cinétique le comportement de ces deux sels est identique, il n'en est pas de même sur le plan de la sensibilité : nous avons vérifié à plusieurs reprises que le perchlorure développe des réactions 1,5 fois plus intenses que le perchlorate.

4. Influence du solvant de réaction.

Comme pour la réaction de Salkowski, nous avons étudié l'influence du solvant accompagnant l'acide sulfurique dans le mélange réactionnel. Pour le mélange 4 nous avons comparé les résultats obtenus avec l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et l'éthanol (figure 72).

. Sur le plan cinétique :

Il faut signaler qu'avec ces deux derniers solvants les mélanges réactionnels sont plus fluides et permettent d'effectuer des lectures dès la 10ème minute de réaction.

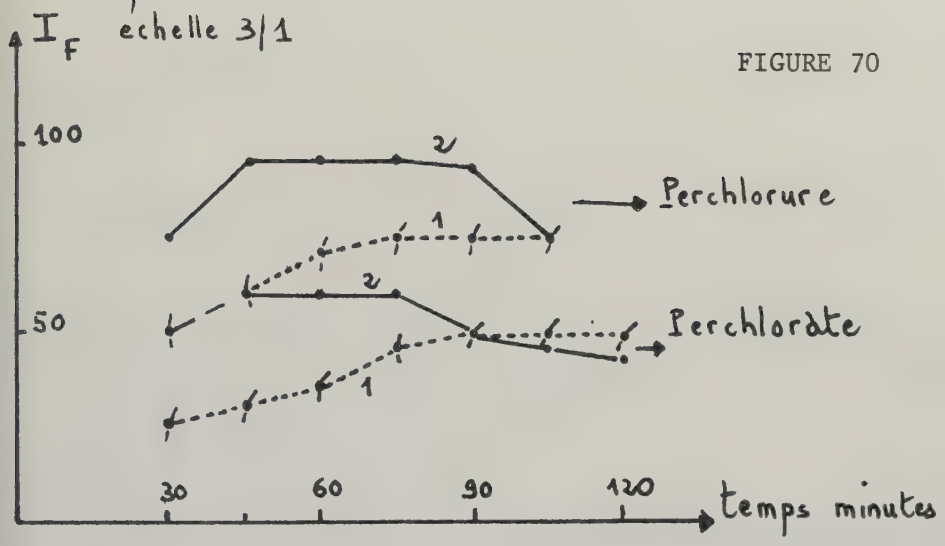


FIGURE 70

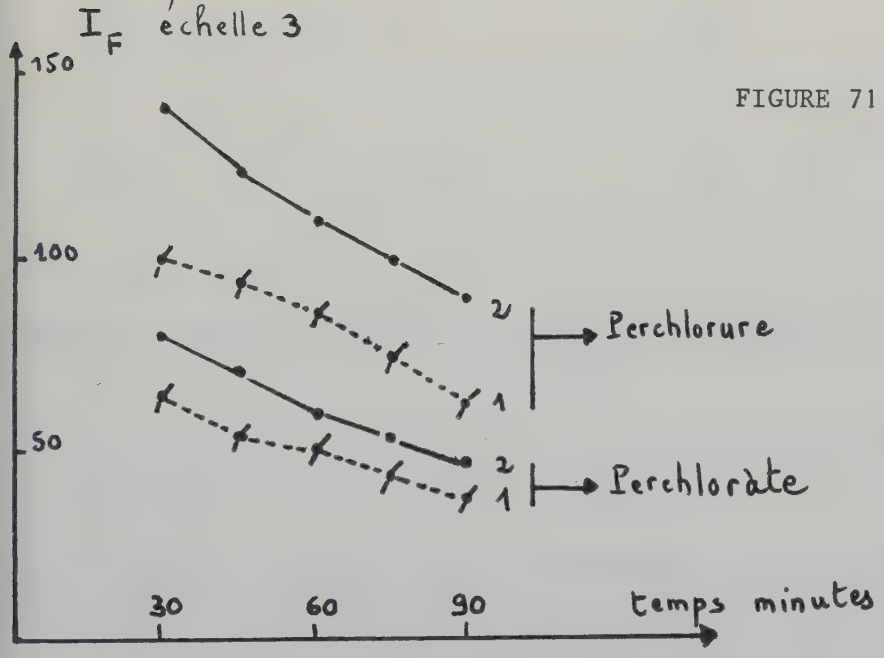


FIGURE 71

FIGURES n° 70 et 71 : Influence de l'anion lié à l'ion ferrique (mélanges 3 et 4 ; 1 = 250 mg/1, 2 = 500 mg/1 de Fe^{+++}, exprimés en perchlorure).

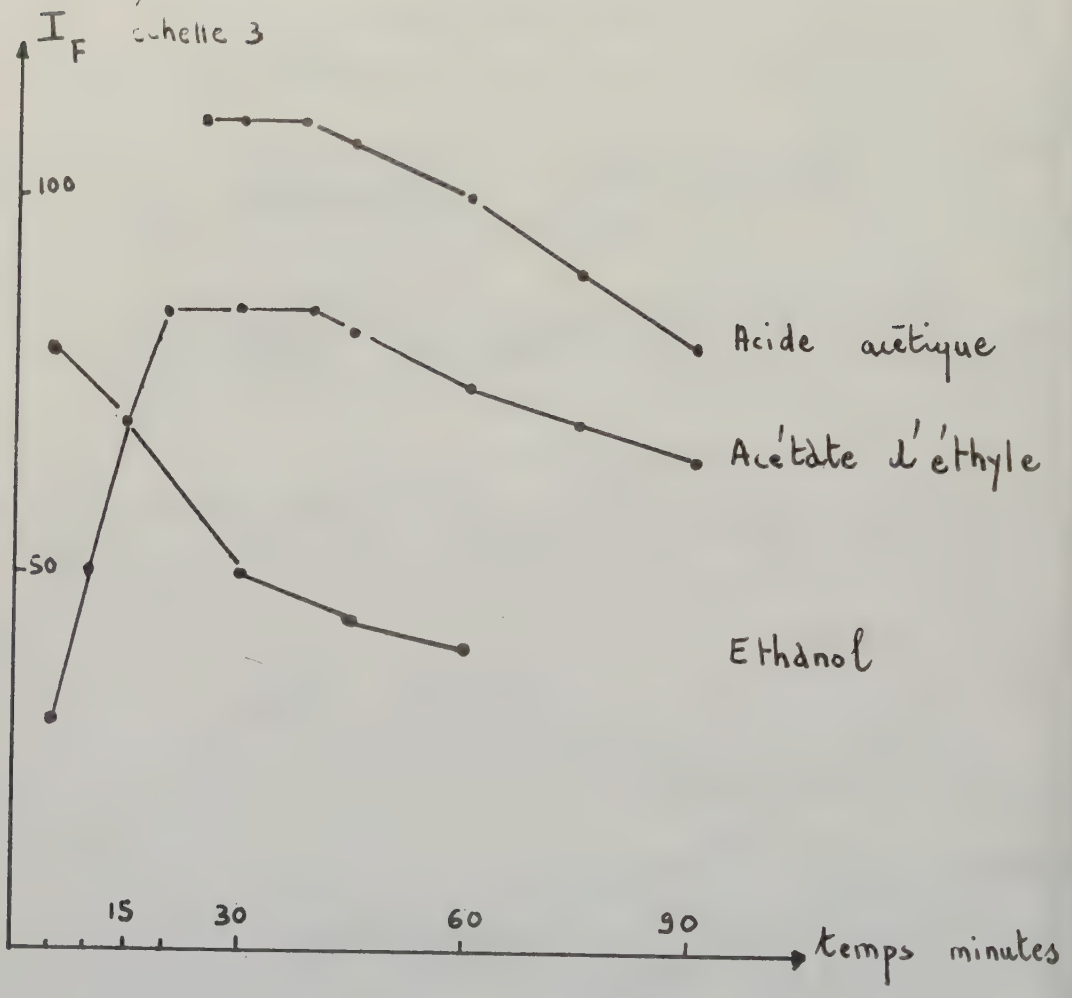


FIGURE N° 72 : Influence du solvant de réaction (mélange n° 4).

L'acétate d'éthyle conduit à une cinétique tout à fait identique à celle fournie par l'acide acétique. Le maximum d'intensité est atteint au bout de 20 minutes et se maintient les 20 minutes suivantes.

Avec l'éthanol au contraire, le maximum est atteint dès la première lecture à 5 minutes, la fluorescence diminue aussitôt et très rapidement dès la dixième minute.

. *Sur le plan de la sensibilité :*

La sensibilité la plus grande est fournie par l'acide acétique. L'acétate d'éthyle et l'éthanol donnent des réactions d'intensité sensiblement égales.

Choix d'un mélange réactionnel.

L'étude de l'influence des constituants sur la fluorescence, tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, permet de définir un mélange réactionnel qui réalise à la fois des conditions de stabilité et de sensibilité autorisant des lectures en série fiables et précises. Nous avons adopté le mélange 3 comportant 2,5 volumes d'acide sulfurique, 2 volumes d'acide acétique et 500 mg/l de perchlorure ferrique. On obtient en effet avec ce mélange une fluorescence maxima au bout de 45 minutes, stable pendant 20 à 30 minutes et suffisamment élevée.

La suite de notre expérimentation est réalisée avec ce mélange réactionnel.

B. Fluorescence comparée du cholestérol et des stérides.

Les résultats fournis par des solutions isopropanoliques contenant 0,5 µg de cholestérol dans la prise d'essai (0,10 ml) sont les suivants :

	Fluorescence
- cholestérol.....	102 (échelle 3)
- linoléate.....	104
- oléate.....	100
- palmitate.....	98
- stéarate.....	90
- linolénate.....	106

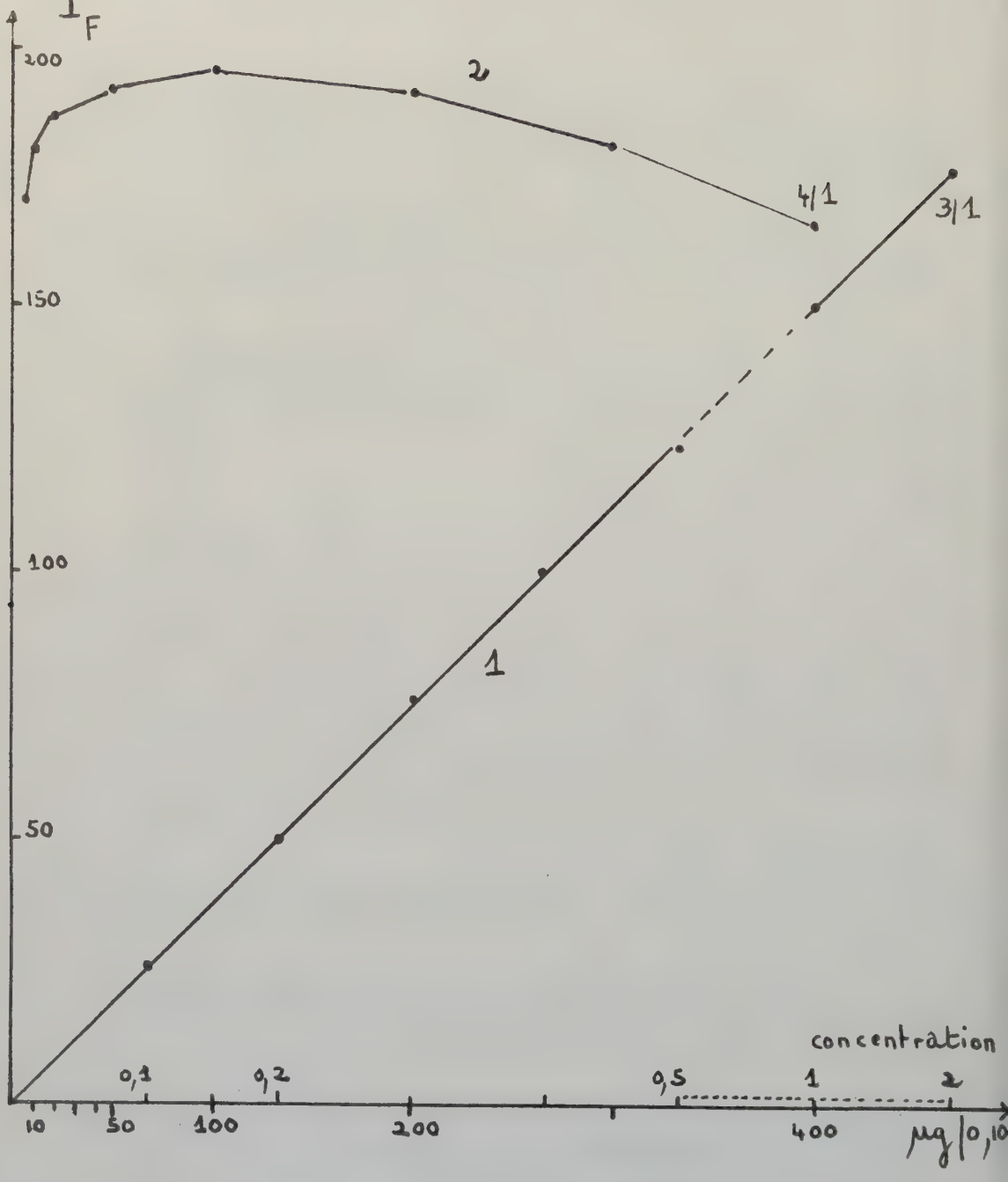


FIGURE N° 73 : Courbes de linéarité (1) et de quenching (2) dans la réaction de Zak I .

A l'exception du stéarate, les esters développent des réactions d'intensité identique à celle du cholestérol.

C. Etude de la fluorescence en fonction de la concentration (figure n°73).

a) Linéarité.

Dans les conditions opératoires choisies (0,10 ml ch/5 ml MR) la réaction de Zak I est linéaire jusqu'à 2 µg de cholestérol.

b) L'inhibition de la fluorescence est obtenue pour une concentration égale à 200 µg dans la prise d'essai.

II. Réaction de Zak II à chaud.

Nous avons constaté que la température provoque un changement dans l'allure spectrale de la réaction de Zak. Nous avons étudié pour cette deuxième réaction l'influence des divers constituants du mélange réactionnel et de la température.

Le mélange réactionnel comporte :

. acide sulfurique 2 volumes,

. acide acétique 3 volumes,

. perchlorure de fer 6 H_2 O 500 mg/l.

Le mode opératoire est toujours identique : 0,10 ml de solution isopropanolique de cholestérol sont introduits dans 5 ml de mélange réactionnel. On agite pendant 30 secondes et on porte au bain-marie à 60°C pendant 20 minutes. La mesure est réalisée à 525 nm pour l'excitation et à 565 nm pour l'émission.

A. Influence des éléments de la réaction.

1. Influence de la température.

La réaction est développée à la température ordinaire et à 40° - 60° - 80° et 100°C. Pour chaque température nous avons étudié l'influence de la durée de chauffage sur la cinétique et sur la sensibilité réactionnelles.

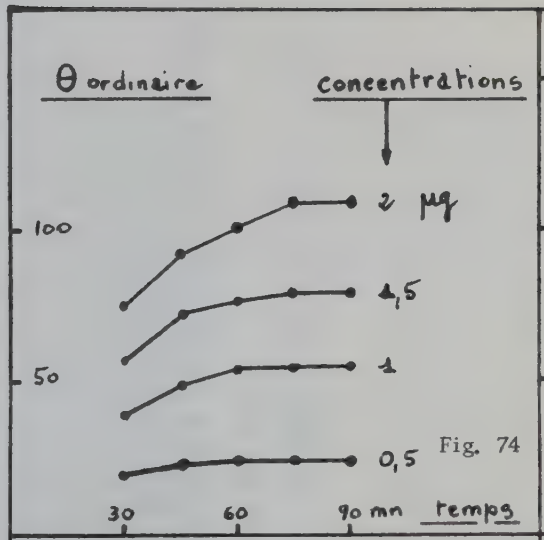


Fig. 74

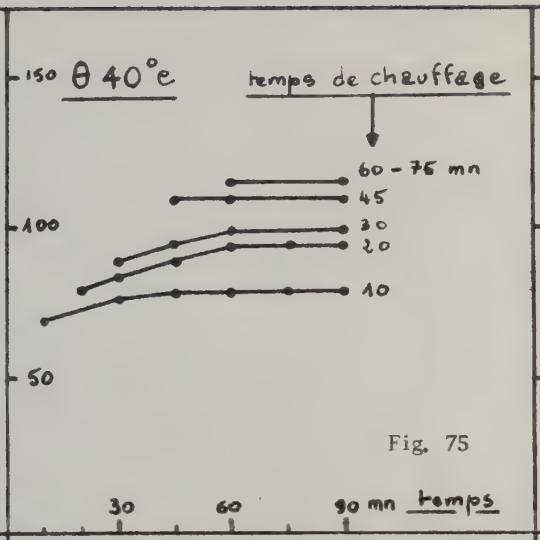


Fig. 75

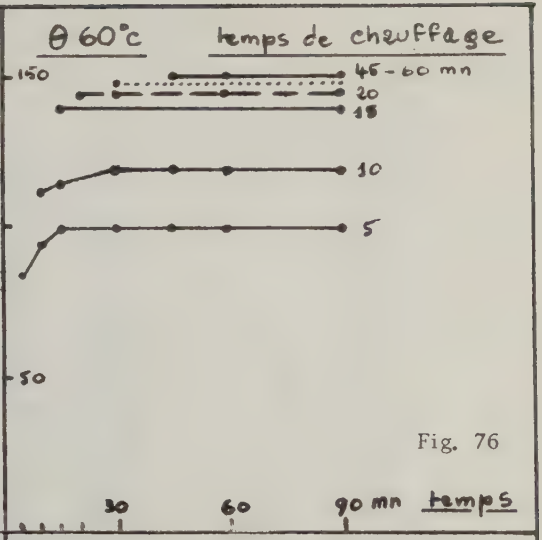


Fig. 76

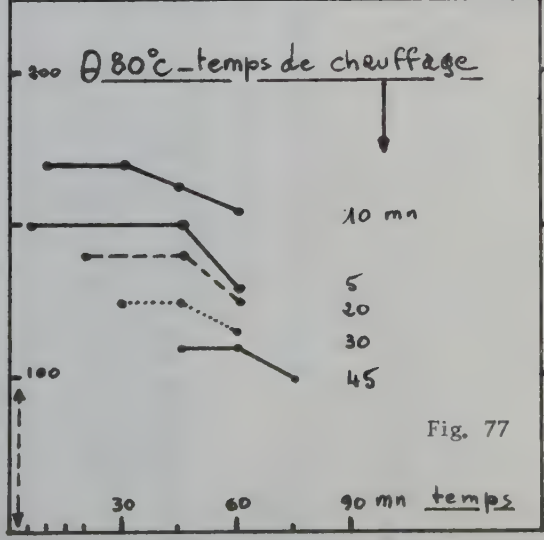


Fig. 77

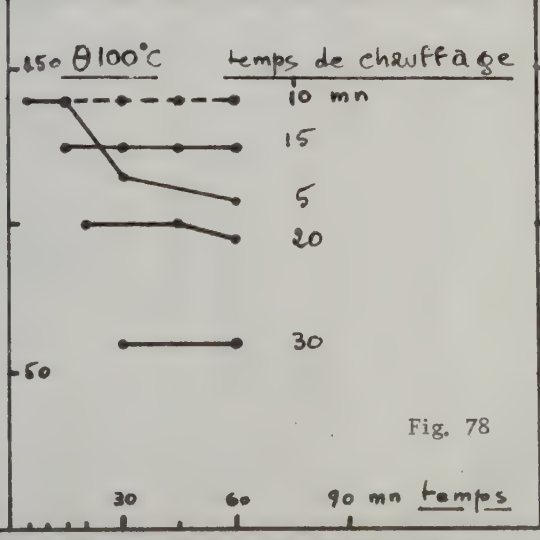
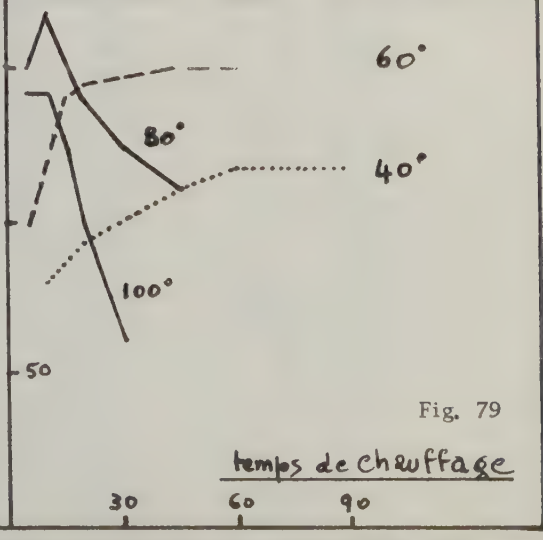


Fig. 78



FIGURES N°. 74 à 79 - Influence de la température dans la réaction de Zak II sur la cinétique (Fig. 74 à 78) et sur la sensibilité (Fig. 79)

a) Sur le plan cinétique :

. à la température ordinaire (fig. 74) :

Le délai d'obtention du maximum de fluorescence varie entre 1 h et 1 h.30 suivant la concentration : la cinétique est d'autant plus rapide que la concentration en cholestérol est faible.

. à chaud :

Le développement de la fluorescence est nettement accéléré :

- à 40°C et 60°C (fig. 75-76), la réaction atteint un plateau respectivement au bout de 45 minutes et de 15 minutes ;
- à 80°C et 100°C (fig.77-78), la fluorescence n'évolue plus dès les cinq premières minutes de chauffage.

b) Sur le plan de la sensibilité :

La sensibilité varie en fonction de la température et de la durée du temps de chauffage (figure 79).

- à 40°C et 60°C, le maximum de fluorescence est atteint respectivement au bout d'une heure et de 45 minutes. Cependant à 60°C, on constate que l'intensité varie très faiblement dès la 20ème minute de chauffage ;
- à 80°C et 100°C, l'intensité maxima est atteinte au bout de 10 minutes. Si la durée de chauffage augmente on observe une dégradation de la fluorescence d'autant plus marquée que la température est élevée.

La sensibilité la plus grande est obtenue pour une température de 80°C pendant une durée de 10 minutes. Cependant, à partir de 60°C, les intensités de fluorescence sont sensiblement identiques.

2. Influence de la concentration en ion ferrique.

Nous avons fait varier la concentration en perchlorure ferrique de 125 à 750 mg/l dans le mélange réactionnel final.

Les résultats obtenus pour deux concentrations égales à 0,5 µg et 1 µg de cholestérol dans la prise d'essai sont schématisés dans la figure n°80:

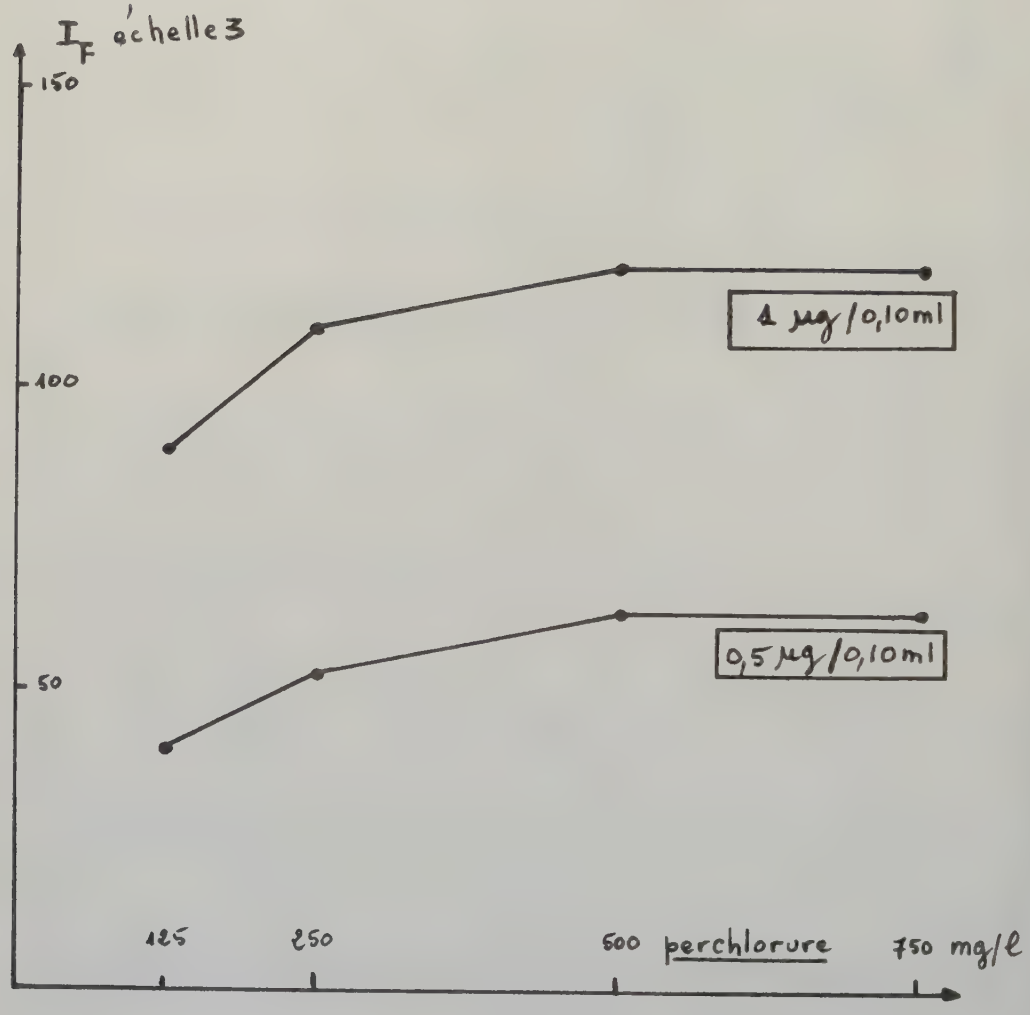


FIGURE N° 80 : Influence de la concenration en ions ferriques.

- Jusqu'à 500 mg/l, la sensibilité augmente de manière proportionnelle à la teneur en ion ferrique. L'augmentation est égale à environ :

  20 pour 100 de 125 à 250 mg/l.

  10 pour 100 de 250 à 500 mg/l.

- A partir de 500 mg/l, il n'y a plus de variations de sensibilité, on atteint un plateau.

3. Influence de l'anion lié à l'ion ferrique .

Comme pour la réaction de Zak I, nous avons comparé le perchlorure et le perchlorate ferrique en opérant à une concentration de 500 mg/l en perchlorure. Les résultats obtenus sont schématisés dans la figure n°81. Les variations de sensibilité sont identiques à celles constatées pour la réaction de Zak I.

4. Influence du solvant de réaction :

Nous avons utilisé l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et l'éthanol.

Les résultats obtenus pour deux concentrations égales à 0,5 µg et 1 µg de cholestérol dans la prise d'essai sont schématisés dans la figure n°82. On retrouve le gradient de réactivité constaté dans l'étude précédente : par ordre croissant - éthanol < acétate d'éthyle < acide acétique.

En conclusion, cette étude nous conduit à proposer pour la suite de notre expérimentation le choix du protocole opératoire suivant :

- mélange réactionnel préparé avec l'acide acétique et renfermant 500 mg/l de perchlorure ferrique ;
- température de 60°C - temps de chauffage 20 minutes.

B. Fluorescence comparée du cholestérol et des stérides.

Les intensités fournies par le cholestérol et ses esters pour une concentration de 0,5 µg de cholestérol dans la prise d'essai sont les suivantes :

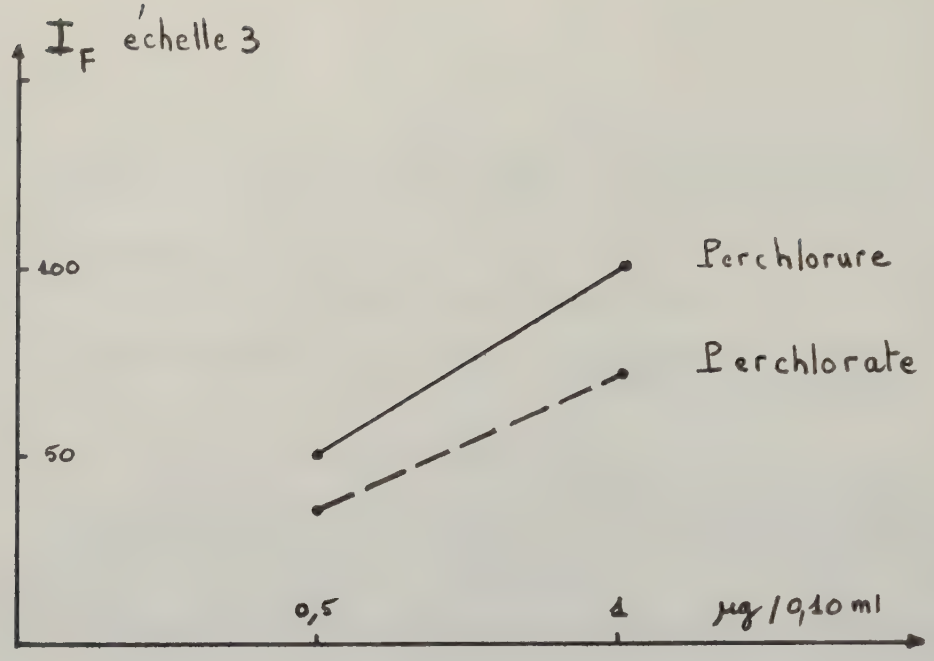


FIGURE N° 81 : Influence de l'anion lié à l'ion ferrique.

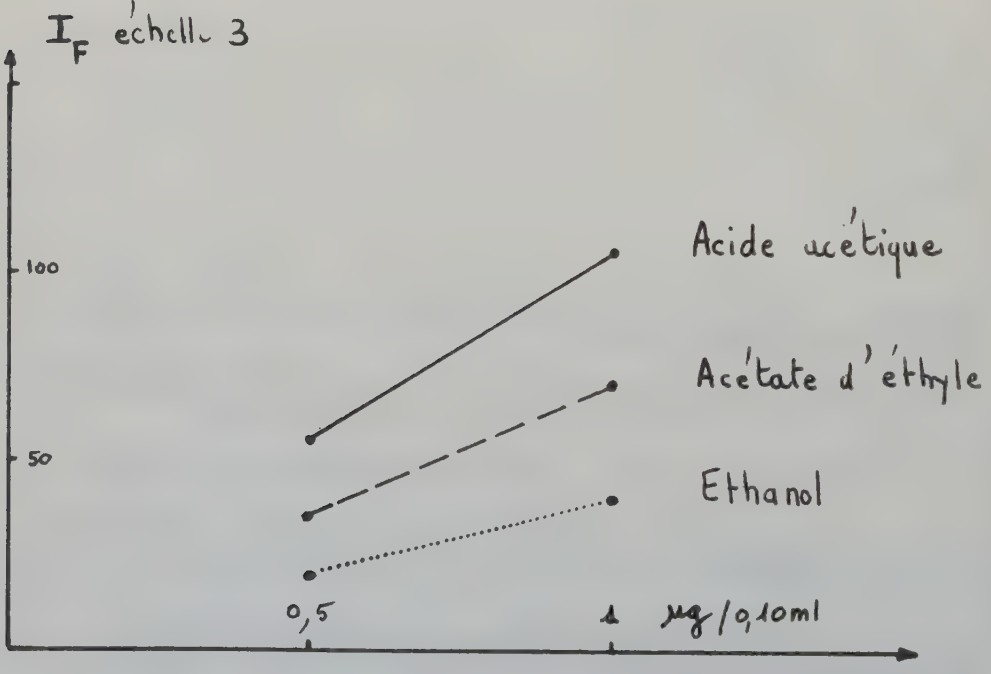
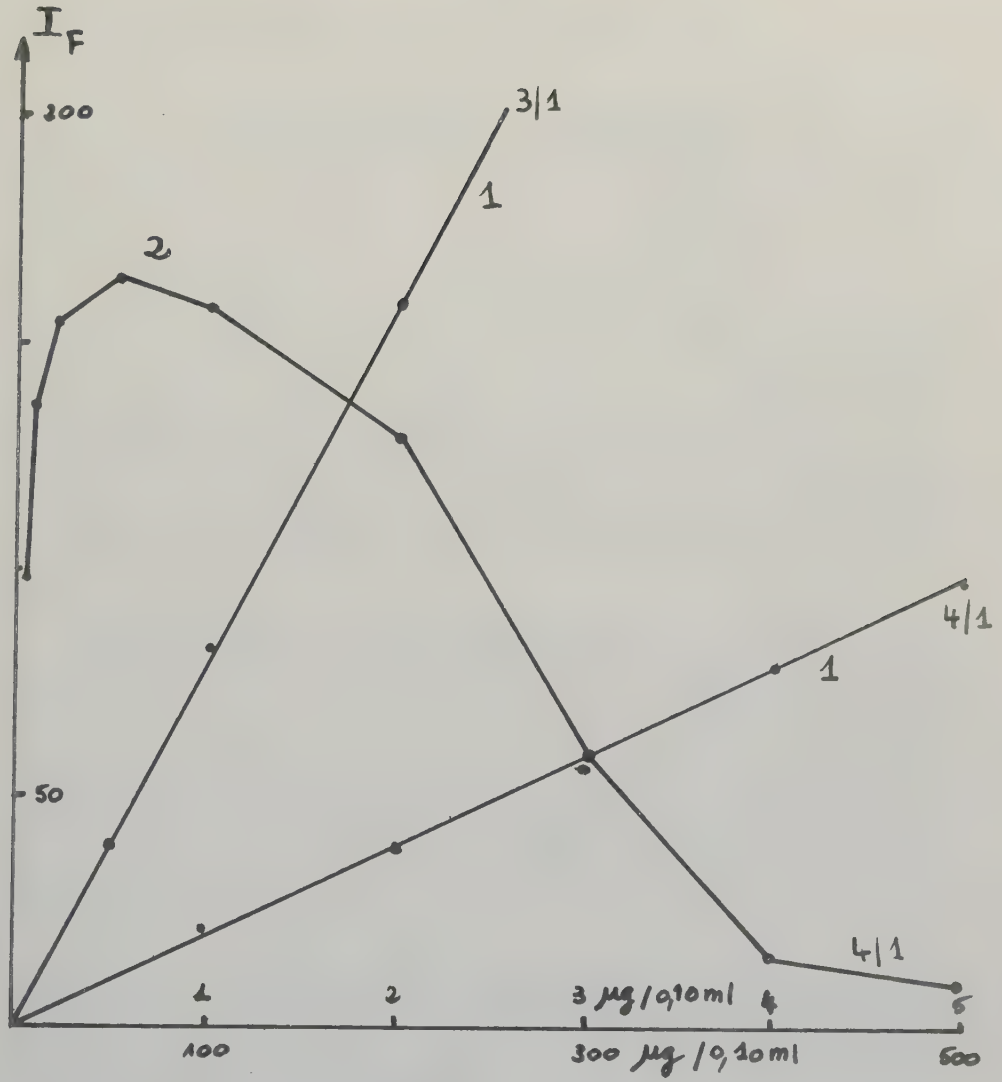


FIGURE N° 82 : Influence du solvant de réaction



URE N° 83 : Courbes de linéarité (1) et de quenching (2) dans la réaction de Zak II.

Fluorescence

. Cholestérol.....68 (échelle 3/1)

. Linoléate.....68

. Oléate.....66

. Palmitate.....65

. Stéarate.....66

. Linolénate.....64

On constate que le cholestérol et ses esters se comportent de manière identique.

C. Etude de la fluorescence en fonction de la concentration.

La figure n°83 représente les courbes obtenues lorsqu'on fait varier la concentration en cholestérol de 0,2 à 500 µg dans la prise d'essai dans les conditions opératoires choisies.

- *Linéarité :* la réaction est linéaire jusqu'à 5µg.
- *Quenching :* l'inhibition de la fluorescence est obtenue pour une concentration égale à 100 µg.

III. DISCUSSION DES RESULTATS.

Nous aborderons la discussion des résultats de l'étude en fluorescence des réactions de Liebermann-Burchard, de Salkowski et de Zak dans trois paragraphes :

1.- Sur le plan purement qualitatif : étude des données spectrales obtenues avec ces trois réactions ;

2.- Sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif : étude des constituants propres à chaque réaction ;

3.- Sur le plan quantitatif : étude comparative de la fluorescence cholestérol-stérides et du degré de sensibilité.

I. LES CARACTERISTIQUES SPECTRALES.

Ces trois réactions présentent des caractéristiques spectrales communes que nous allons essayer d'élucider.

a) La réaction de Liebermann-Burchard.

- L'allure spectrale est tout à fait différente de celle décrite jusqu'à présent, mais aucun auteur n'a apporté de justification spectrale au choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. On peut l'expliquer par une raison purement instrumentale : l'appareillage utilisé a toujours été constitué de fluorescimètres à filtres dont la définition spectrale ne permet pas une sélection rigoureuse des longueurs d'onde et par conséquent une étude précise des différents spectres.

- On constate que, contrairement au principe classique de la fluorimétrie, la longueur d'onde d'excitation (λ Ex = 470 nm) ne correspond pas à la longueur d'onde maxima utilisée en colorimétrie (λ max = 615 nm). On peut penser, de manière logique, que si en colorimétrie, on évalue le cation pentaénylique responsable de la coloration bleue (λ max = 615 nm), en fluorimétrie on évalue une étape antérieure de la réaction de LIEBERMANN-BURCHARD correspondant au cation triénylique dont le maximum d'absorption en colorimétrie se situe à 485 nm.

Nous avons d'ailleurs vu dans le chapitre I de la deuxième partie lors de l'étude de l'influence des solvants qu'il est possible dans des conditions expérimentales précises (concentration plus importante en acide sulfurique) de visualiser ce pic.

b) La réaction de Salkowski-Zak.

+ A la température ordinaire :

. On retrouve les mêmes caractéristiques spectrales que celles de la réaction de Liebermann, avec seulement un léger décalage de la longueur d'émission dans la réaction de Salkowski (λ Emission = 510 nm). Ces résultats sont

tout à fait concordants avec ceux obtenus par FLACK (45) qui élimine l'influence du cholestérol (λ Excitation = 470 nm ; λ Emission = 505 nm) sur la détermination de la corticostérone dans le sang en effectuant la lecture de fluorescence à 525 nm, maximum d'émission pour ce métabolite.

. La longueur d'onde d'émission correspond à la longueur d'onde d'absorption du cation triénylique mis en évidence par BURKE (23) pour la réaction de Zak. Nous avons nous-mêmes constaté la prédominance de ce pic en colorimétrie à la température ordinaire en opérant sur des mélanges réactionnels enrichis en acide sulfurique. Dans la réaction de Zak, en présence d'ion ferrique, l'évolution spectrale vers la formation du cation tétraénylique coloré en violet (λ max = 565 nm), évalué dans les méthodes classiques, se fait très lentement.

+ A chaud :

En présence d'ion ferrique, la réaction de Zak évolue rapidement et complètement en faveur du cation triénylique. Il en résulte, en fluorimétrie, un changement des caractéristiques spectrales (λ Excitation = 525 nm ; λ Emission = 565 nm). Il semble donc que la fluorescence mesurée dans ces conditions correspond de manière prépondérante à la structure tétraénylique.

II. INFLUENCE DES CONSTITUANTS DU MELANGE REACTIONNEL.

a) La réaction de Liebermann-Burchard.

1. Influence de l'acide sulfurique.

+ En fluorimétrie, l'influence de l'acide sulfurique apparaît nettement prépondérante par rapport à celle de l'anhydride acétique.

+ Les résultats que nous avons obtenus doivent être discutés sur trois points et en relation avec ce que nous avions constaté en colorimétrie lors de l'étude de l'influence des solvants.

- *Sur le plan spectral :*

L'allure spectrale est indépendante de la concentration en acide sulfurique. En colorimétrie, au contraire nous avons vu que pour les mélanges réactionnels comportant plus de 20 % d'anhydride acétique, on observe un changement dans l'allure spectrale en fonction de la teneur en acide sulfurique :

- un seul pic à 615 nm pour des concentrations inférieures à 25 %,
- deux pics respectivement situés à 485 et 615 nm avec prédominance du pic à 615 nm pour une concentration de 25 %. Dans ces deux cas, cependant, la coloration obtenue est bleue.
- trois pics respectivement situés à 485-550 et 615 nm avec prédominance du pic à 485 nm, pour une concentration de 33 %. La coloration obtenue est gris-violet. Il faut admettre que pour cette concentration d'acide sulfurique, la réaction développée n'est pas une réaction de Liebermann classique, c'est-à-dire, correspondant en totalité au cation pentaénylique. La forte concentration d'acide sulfurique favorise la formation du cation triénylique.

En fluorimétrie, seul le cation triénylique est fluorescent puisque l'allure spectrale n'est pas influencée par les variations de la concentration en acide sulfurique. On observe, toutefois, un léger décalage entre les longueurs d'onde d'absorption en colorimétrie (λ max = 485nm) et la longueur d'onde d'excitation en fluorimétrie (λ Excitation = 470 nm).

- *Sur le plan cinétique :*

On constate que si l'acide sulfurique n'influence pas de manière significative la vitesse de réaction (à l'exception du mélange II_4), il apporte par contre un effet très important de stabilisation de la fluorescence du cation triénylique.

- *Sur le plan de la sensibilité :*

Comme nous l'avons constaté en colorimétrie à 485 nm, l'intensité de la fluorescence augmente lorsque

la teneur en acide sulfurique s'élève. La sensibilité maxima dans le cadre d'une réaction de Liebermann classique (coloration bleue) est atteinte pour une concentration égale à 25 %. Il est remarquable de constater que cette concentration est aussi celle qui développe une intensité maxima à 615 nm en colorimétrie.

La différence très importante de sensibilité lorsqu'on passe de 25 à 33 % d'acide sulfurique s'explique par ce que nous avons déjà signalé sur le plan spectral : pour une concentration de 33 %, le pic à 485 nm est prédominant et oriente cette réaction vers une réaction de type Salkowski.

2. Influence de l'anhydride acétique.

- Sur le plan cinétique :

L'influence de l'anhydride acétique n'apparaît que lorsque la concentration en acide sulfurique est peu importante (16,66 %). Il accélère la vitesse de réaction mais il en résulte une faible stabilité de la fluorescence. C'est d'ailleurs ce que nous avons constaté en colorimétrie à 615 nm.

- Sur le plan de la sensibilité :

Comme en colorimétrie mais dans des proportions beaucoup plus faibles la sensibilité diminue lorsque le milieu s'appauvrit en anhydride acétique.

Le mélange réactionnel que nous proposons réalise les conditions optima à la fois de cinétique, de stabilité et de sensibilité. Il donne en colorimétrie une réaction de Liebermann classique (coloration bleue λ max = 615 nm).

b) La réaction de Salkowski.

1. Influence de l'acide sulfurique.

Il influence à la fois la cinétique et la sensibilité réactionnelles.

- Sur le plan cinétique :

Les conditions optima de vitesse de réaction sont réalisées pour des concentrations comprises entre 25 et 40%. En dehors de ces limites, les cinétiques sont très lentes puisqu'elles se poursuivent au-delà de deux heures.

- Sur le plan de la sensibilité :

Il existe un pourcentage d'acide sulfurique précis pour lequel la fluorescence obtenue passe par un maximum. Celui-ci est influencé par la nature du solvant accompagnant l'acide sulfurique dans le mélange réactionnel : il est de 33 % pour les solvants classiques : acide acétique et acétate d'éthyle et de 40 % pour l'éthanol. Cette concentration de 33 % est la même que celle trouvée pour la réaction de Liebermann-Burchard.

2. Influence du solvant.

La sensibilité est considérablement influencée par la nature du solvant utilisé ; c'est ainsi qu'il existe un gradient de sensibilité de type 1, 2, 3 pour l'éthanol, l'acétate d'éthyle, l'acide acétique au bénéfice de l'acide acétique.

3. Influence de la température.

La température n'exerce sur cette réaction qu'un effet purement cinétique en accélérant le développement de la fluorescence.

c) La réaction de Zak.

1. Réaction de Zak I à la température ordinaire.

Comme nous l'avons réalisé pour la réaction de Liebermann-Burchard et pour la réaction de Salkowski, nous avons mené parallèlement à l'étude en fluorimétrie, une étude colorimétrique de cette réaction avec les mêmes mélanges réactionnels mais en utilisant une concentration de cholestérol beaucoup plus importante 2 g/l dans l'isopropanol. En colorimétrie à 470 nm, nous avons obtenu des résultats tout à fait en accord avec la fluorimétrie tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

1. Influence de l'acide sulfurique :

- Sur le plan qualitatif :

En fluorescence, l'allure spectrale à la température ordinaire est indépendante de la concentration en acide sulfurique. Nous avons constaté qu'en colorimétrie pour des concentrations comprises entre 40 et 60 % le spectre d'absorption présente deux maximums d'absorption situés respectivement à 410 et 470 nm et un dôme situé à 550 nm. Le pic à 470 nm prédomine très nettement, il correspond au cation triénylique que l'on évalue en fluorescence puisque la longueur d'onde d'excitation est situé à cette même longueur d'onde.

Sur le plan cinétique une concentration d'acide sulfurique élevée favorise la formation du cation triénylique et bloque par conséquent l'évolution vers l'étape suivante, c'est-à-dire, la formation du cation tétraénylique (λ max = 550 nm en colorimétrie). Une stabilisation importante est réalisée pour une concentration de 55 % d'acide sulfurique, mais on constate parallèlement un ralentissement de la vitesse de réaction.

- Sur le plan quantitatif :

Le maximum de sensibilité est atteint pour une concentration égale à 50 % d'acide sulfurique mais la réaction est alors très instable. Il semble donc que cette concentration conduise à la formation totale du cation triénylique mais que celui-ci se transforme progressivement dès sa formation en cation tétraénylique.

En augmentant la concentration d'acide sulfurique du mélange réactionnel, il est possible, comme nous venons de le voir, de ralentir la cinétique et de stabiliser la fluorescence obtenue tout en conservant un degré de sensibilité suffisant. Nous avons donc choisi un mélange réactionnel comportant 55 % d'acide sulfurique.

2. Influence de l'ion ferrique :

L'ion ferrique jouant un rôle important dans le mécanisme d'oxydation de la réaction de Zak, il est normal que nous ayons constaté des variations de fluorescence en fonction de la concentration d'ion ferrique :

- Sur le plan spectral et cinétique :

Plus la concentration en ion ferrique augmente, plus la cinétique est rapide : le cation triénylique se forme immédiatement, il en résulte parallèlement de manière logique une évolution plus rapide vers la formation du cation tétraénylique donc une instabilité plus grande de la réaction à 470 nm aussi bien en colorimétrie qu'en fluorimétrie.

- Sur le plan de la sensibilité :

Pour une concentration donnée d'acide sulfurique, la formation du cation triénylique est proportionnelle à la concentration d'ion ferrique. L'intensité de la fluorescence atteint un maximum pour une concentration de 500 mg/l de chlorure ferrique.

3. Influence de l'anion lié à l'ion ferrique :

Pour des concentrations en fer identiques, la fluorescence développée par le chlorure ferrique est supérieure à celle obtenue avec le perchlorate. Ces résultats sont confirmés en colorimétrie. Il est difficile de fournir une explication à ce sujet car l'anion perchlorique oxydant majeur semblerait à priori devoir favoriser le développement de la réaction.

4. Influence du solvant :

L'éthanol et l'acétate d'éthyle améliorent nettement la fluidité du mélange réactionnel ; c'est la raison pour laquelle nous les avons étudiés. Malheureusement, ils développent une fluorescence plus faible que l'acide acétique.

2. La réaction de Zak II à chaud.

1. Influence de la température :

Pour ce paramètre, nous avons confirmé en fluorescence, les résultats obtenus par les différents auteurs en colorimétrie. Plus la température est élevée plus la cinétique est rapide.

Sur le plan de la sensibilité, on peut choisir indifféremment les conditions opératoires suivantes : 20 minutes à 60°C ou dix minutes à 100°C. On obtient en effet dans les deux cas la même intensité et la fluorescence est très stable permettant des lectures en série.

2. Influence de l'ion ferrique :

Une concentration de 500 mg/l de chlorure ferrique réalise les conditions optima de sensibilité. Cette concentration est d'ailleurs celle utilisée en colorimétrie par la plupart des auteurs.

3. Influence de l'anion lié à l'ion ferrique. Influence du solvant de réaction :

Pour ces deux paramètres, on peut faire les mêmes remarques que pour la réaction de Zak I. Les résultats fournis par l'éthanol sont confirmés par FRANEY et AMADOR (49) qui ont utilisé ce solvant en colorimétrie.

Par conséquent, le mélange réactionnel le mieux adapté à l'utilisation de la réaction de Zak est celui qui comporte l'acide acétique comme solvant et le chlorure ferrique comme sensibilisant.

III. ETUDE COMPARATIVE.

1. Fluorescence cholestérol-stérides.

Une étude dans ce domaine nous a paru absolument nécessaire compte tenu des faits connus en colorimétrie.

On sait en effet que dans la réaction de Liebermann-Burchard les esters du cholestérol conduisent pour une molarité identique à une surabsorption indiscutable par rapport au cholestérol lui-même (13, 31, 72, 84, 125). Par contre, sur le plan cinétique, le comportement des esters est identique à celui du cholestérol (33).

Dans la réaction de Zak, il a été bien démontré par GIRARD et ASSOUS (6) que le comportement des esters pouvait être, sur le plan cinétique, dissocié de celui du cholestérol en jouant sur la température. D'autre part,

CROCKETT (33) a précisé les différences de comportement des esters et du cholestérol en fonction des deux paramètres (température et temps) directement liés à la sensibilité obtenue.

En fluorescence, il apparaît au contraire que, quelle que soit la réaction étudiée, le cholestérol et ses esters développent des intensités identiques, à l'exception du stéarate dans la réaction de Salkowski. Dans la pratique, cet inconvénient est tout à fait mineur car le stéarate constitue une proportion très faible des esters physiologiques (2,6 % en moyenne (142)) et, à la limite, on peut donc considérer que l'erreur introduite par cet ester est tout à fait négligeable (inférieure à 1 %).

On peut conclure que les méthodes fluorimétriques présentent l'avantage sur les méthodes colorimétriques de ne pas nécessiter de saponification ou de correction de la surabsorption des esters.

2. *Degré de sensibilité des différentes réactions.*

Le tableau 26 résume les caractéristiques de chacune des réactions utilisées (colonne 1, 2, 3).

Nous avons par ailleurs essayé de déterminer le degré de sensibilité relatif de chaque réaction en colorimétrie et en fluorimétrie dans des conditions opératoires théoriques identiques (0,10 ml d'échantillon dans 5 ml de mélange réactionnel) :

- En colorimétrie, (colonne 4-100 µg de cholestérol), si l'on affecte la réaction de Salkowski, réaction la moins sensible, du coefficient 1, on trouve par ordre croissant :

  . Réaction de Salkowski 1 < Réaction de Liebermann-Burchard 1,3 < Réaction de Zak II 5,5 < Réaction de Zak I 9.

- En fluorimétrie, (colonne 5-0,5 µg de cholestérol) ; le coefficient 1 est affecté à la réaction de Liebermann-Burchard qui est la réaction la moins sensible dans ce type de détection, on a par ordre croissant :

  . Réaction de Liebermann-Burchard 1 < Réaction de Salkowski 7 < Réaction de Zak II 13 < Réaction de Zak I 41.

TABLEAU n° 26 - Sensibilités comparées des réactions de Liebermann-Burchard, Salkowski et Zak en colorimétrie et en fluorimétrie.

	LIEBERMANN-BURCHARD	*SALKOWSKI*	*ZAK II*	*ZAK I*
1- Echantillon ml	0,20	0,10	0,10	0,10
2- Mélange réactionnel ml	4(3/3/6)	5(2/4)	5(2/3)	5(2,5/2)
3- Linéarité (µg cholestérol)	0-40	0-10	0-5	0-2
Quenching (µg cholestérol)	600	-	100	200
4- Colorimétrie. D.O. cuve 10 mm 100 µg/0,10 ml	0,12	0,09	0,50	0,82
Coefficient de sensibilité	1,3	1	5,5	9
5- Fluorimétrie. Intensité 0,5 µg/ 0,10 ml échelle 3	3	20	40	125
Coefficient de sensibilité	1	7	13	41
6- Sensibilité comparée.Fluorimétrie. Colorimétrie + Fluorimétrie. 50. échelle 3/1 µg/0,10 ml	8	1,25	0,5	0,2
Rapport sensibilité Fluorimétrie/Colorimétrie	50	400	200	300
+ Colorimétrie D.O. 0,50 µg/0,10 ml	400	500	100	60

Si l'on admet d'autre part qu'une densité optique de 0,50 lue en cuve de 10 mm, en colorimétrie donne une garantie de précision à peu près équivalente à une intensité de fluorescence de 50 lue dans les mêmes conditions sur l'échelle 3/1, on a alors la possibilité de comparer valablement les degrés de sensibilité obtenus en colorimétrie et en fluorimétrie (colonne 6). On constate que les méthodes fluorimétriques sont selon le type de réaction considérée, 50 à 400 fois plus sensiblesque les méthodes colorimétriques, bien entendu en tenant compte du matériel dont nous disposons.

--oOo--

CINQUIÈME PARTIE

- APPLICATIONS DE LA SPECTROFLUORESCENCE À LA DÉTERMINATION DU CHOLESTÉROL DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES.

- LIMITES DE SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE FLUORIMÉTRIQUE.

CHAPITRE I

APPLICATIONS À LA DÉTERMINATION DU CHOLESTÉROL DANS DIVERS MILIEUX BIOLOGIQUES

Après cette étude théorique, nous avons essayé d'appliquer ces réactions à la détermination du cholestérol dans divers milieux biologiques.

Aucun protocole en voie directe n'étant décrit en fluorimétrie, nous avons tenté de doser le cholestérol par cette voie en comparant les résultats obtenus avec une méthode semi-extractive.

A. APPLICATION AU DOSAGE DU CHOLESTEROL SERIQUE.

Cette étude a été réalisée sur des sérums dont le taux de bilirubine était inférieur à 10 mg/l. En effet, nous avons préféré consacrer un paragraphe particulier à l'étude des éventuelles interférences dans les méthodes en fluorescence. Ce paragraphe sera exposé ultérieurement.

1. MODE OPERATOIRE.

Compte tenu des sensibilités relatives exposées précédemment, les dilutions et les extractions du sérum sont réalisées dans les conditions suivantes :

Méthodes	*Dilution ou extraction*	*µg de cholestérol dans la prise d'essai pour 2 g/l*
LIEBERMANN-BURCHARD.....	1/50	8
SALKOWSKI.....	1/100	2
ZAK II.....	1/500	0,4
ZAK I.....	1/1000	0,2

Ces chiffres, qui représentent des valeurs tout à fait commodes, ont été choisis :

- d'une part pour tenir compte de la zone de linéarité propre à chacune des méthodes ;
- d'autre part pour obtenir une déviation galvanométrique comprise entre 30 et 80 avec un sérum contenant 2 g/l de cholestérol.

Parallèlement, on prépare à partir d'un sérum étalon (sérachol lot n° 2.358.125 à 4,20 g/l) une gamme d'étalonnage.

Le sérachol est d'abord dilué dans du sérum physiologique de façon à obtenir des solutions mères à 1,05, 2,10, 3,15, et 4,20 g/l.

Ces solutions sont d'abord diluées 1/50 dans du sérum physiologique (méthode directe) ou extraites dans les mêmes proportions par du chloroforme ou de l'isopropanol (méthode semi-extractive). Les solutions filles ainsi obtenues constituent la gamme d'étalonnage de la méthode de LIEBERMANN-BURCHARD.

Dans un deuxième temps, ces mêmes solutions filles sont diluées respectivement au 1/2, 1/10 et au 1/20 dans du sérum physiologique ou dans de l'isopropanol pour l'étalonnage des méthodes de SALKOWSKI (dilution 1/100), ZAK II (dilution 1/500) et ZAK I (dilution 1/1000).

2. *RESULTATS.*

Nous avons déterminé le taux de cholestérol sur 48 sérums par la méthode de LIEBERMANN-BURCHARD et sur 21 sérums par les méthodes de SALKOWSKI, ZAK I et ZAK II selon le protocole direct et le protocole semi-extractif. Les paramètres statistiques des différentes données sont représentés dans le tableau n°27.

Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus par ces différentes méthodes à ceux fournis par la méthode colorimétrique directe de LIEBERMANN-BURCHARD prise comme référence. Les courbes de régression sont reportées dans les figures 84 à 91 et les équations de ces courbes sont résumées dans le tableau n°28.

On constate l'existence d'une très bonne corrélation entre les méthodes fluorimétriques et la méthode de référence ($r = 0,98$ dans la majorité des cas). Il est par conséquent tout à fait possible d'envisager le dosage du cholestérol en fluorimétrie selon un protocole direct.

- *Détermination du cholestérol chez le nouveau-né.*

Le faible volume de sérum utilisé dans la réaction de ZAK I nous a permis d'envisager la détermination de la cholestérolémie du nouveau-né.

Le dosage de ce métabolite en pédiatrie est rendu très difficile par les méthodes colorimétriques pour deux raisons :

- d'une part, le volume de sérum utilisable est toujours très faible ;

TABLEAU N° 27 - Paramètres statistiques de distribution des différentes données.

Echantillons	*Moyenne cholestérol g/l*	*Variance*	*Ecart type*	*Coefficient de variation*	*Minimum cholestérol g/l*	*Maximum cholestérol g/l*
N = 48						
Liebermann-Burchard Colorimétrie directe : Référence	2,16	0,60	0,78	2,80	0,90	3,80
Liebermann-Burchard directe	2,13	0,61	0,78	2,74	0,90	4
Liebermann-Burchard semi-extractive	2,08	0,60	0,78	2,69	0,95	4,20
N = 21						
Salkowski directe	2,20	0,45	0,67	3,28	1,10	3,90
Salkowski semi-extractive	2,09	0,43	0,65	3,21	0,95	3,60
ZAK I directe	2,24	0,50	0,71	3,16	1	3,90
ZAK I semi-extractive	2,13	0,45	0,67	3,20	0,95	3,50
ZAK II directe	2,20	0,53	0,73	3,02	0,90	4
ZAK II semi-extractive	2,14	0,46	0,67	3,13	0,95	3,70

TABLEAU N° 28 - EQUATIONS DES COURBES DE REGRESSION

Méthodes fluorimétriques	r^2	r	*équation de la droite*	*v (y en x)*
Liebermann-Burchard directe	0,96	0,98	y = 0,075 + 0,98 x	0,023
Liebermann-Burchard semi-extractive	0,96	0,98	y = 0,166 + 0,97 x	0,024
Salkowski directe	0,96	0,98	y = -0,08 + 1,04 x	0,020
Salkowski semi-extractive	0,97	0,98	y = -0,04 + 1,07 x	0,014
ZAK I directe	0,96	0,98	y = 0,003 + 0,98 x	0,019
ZAK I semi-extractive	0,96	0,98	y = -0,02 + 1,04 x	0,023
ZAK II directe	0,94	0,97	y = 0,12 + 0,95 x	0,030
ZAK II semi-extractive	0,97	0,98	y = 0,018 + 1,04 x	0,016

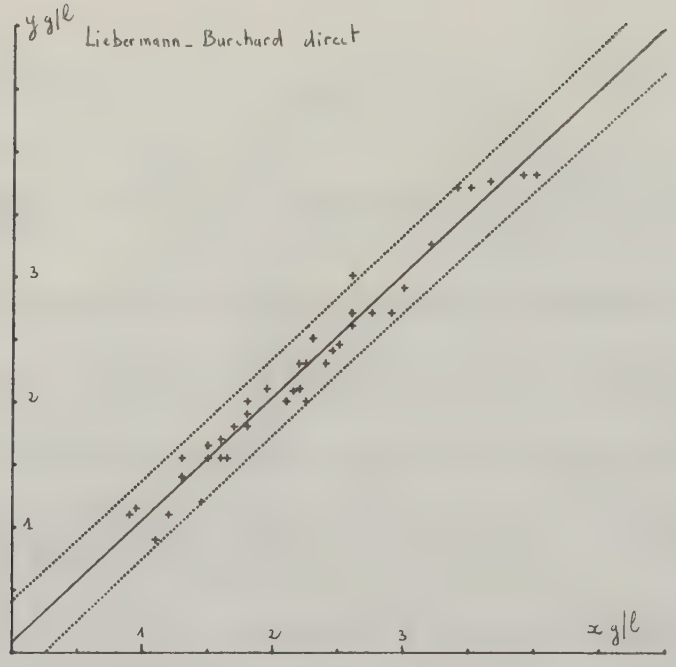


FIGURE N° 84 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode fluorimétrique directe de Liebermann - Burchard.

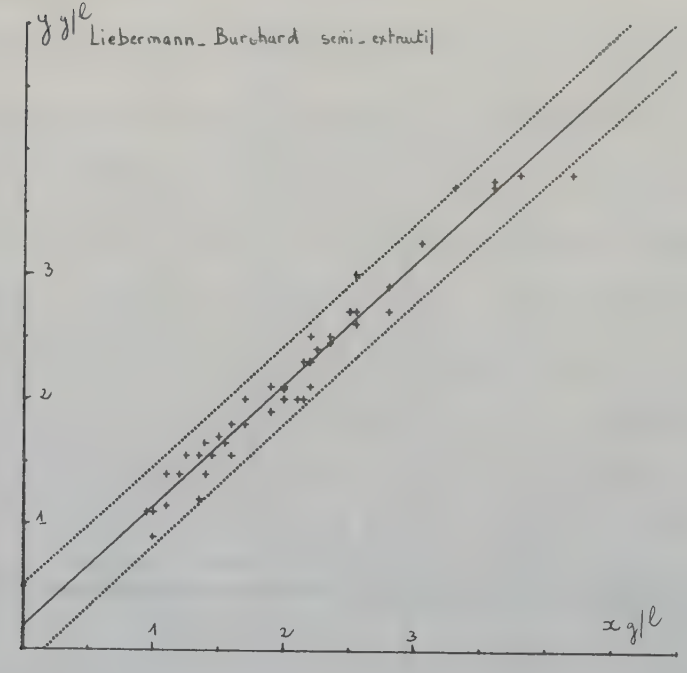


FIGURE N° 85 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode fluorimétrique semi-extractive de Liebermann-Burchard.

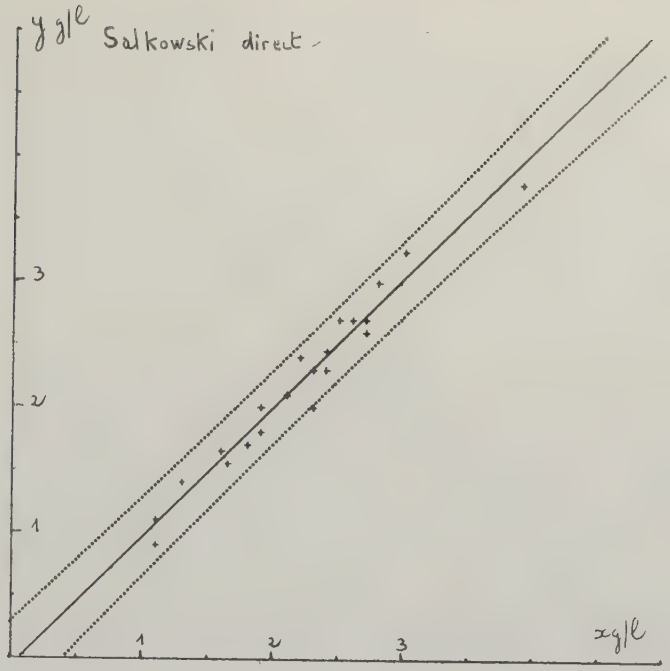


FIGURE N° 86 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode fluorimétrique directe de Salkowski.

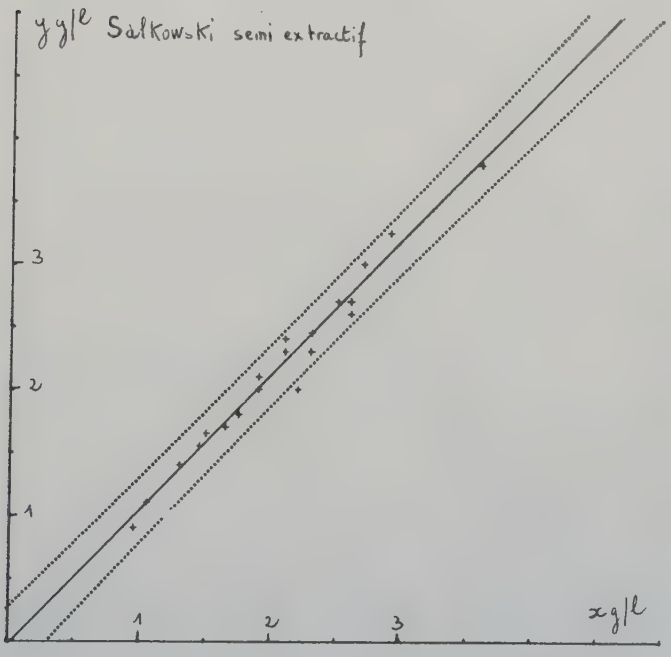


FIGURE N° 87 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode fluorimétrique semi-extractive de Salkowski.

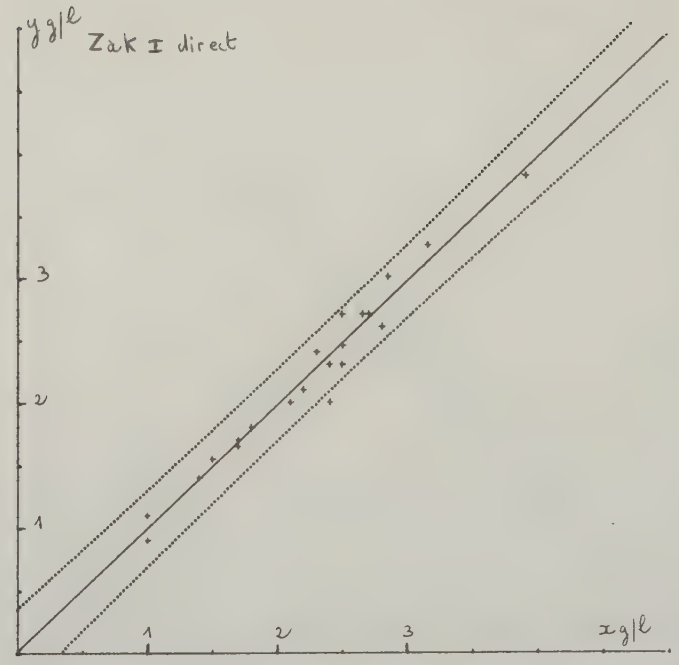


FIGURE N° 88 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode fluorimétrique directe de Zak I.

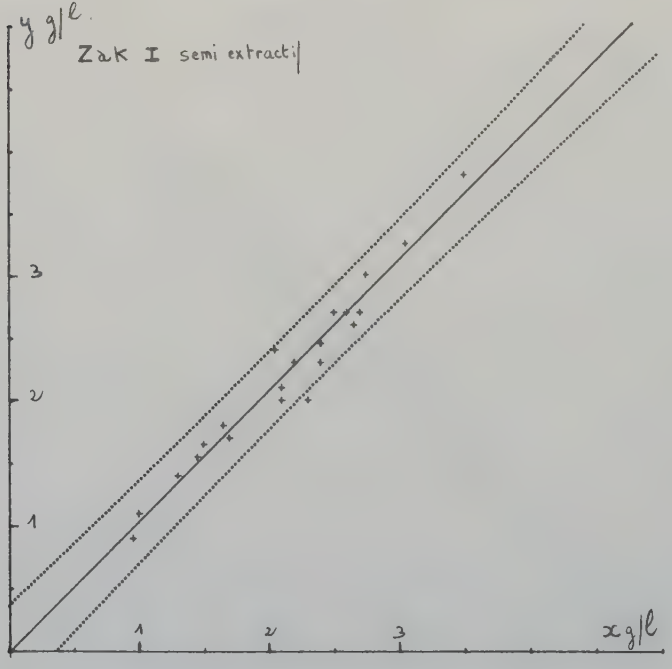


FIGURE N° 89 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode fluorimétrique semi - extractive de Zak I.

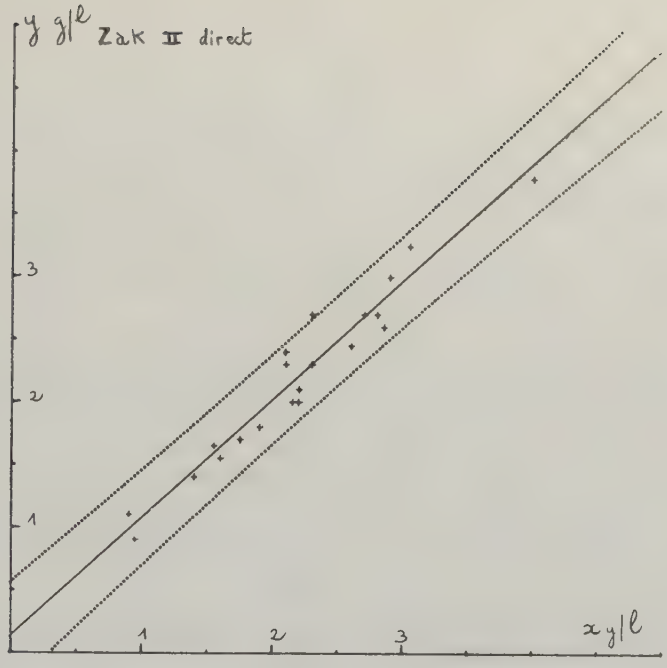


FIGURE N° 90 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode directe de Zak II.

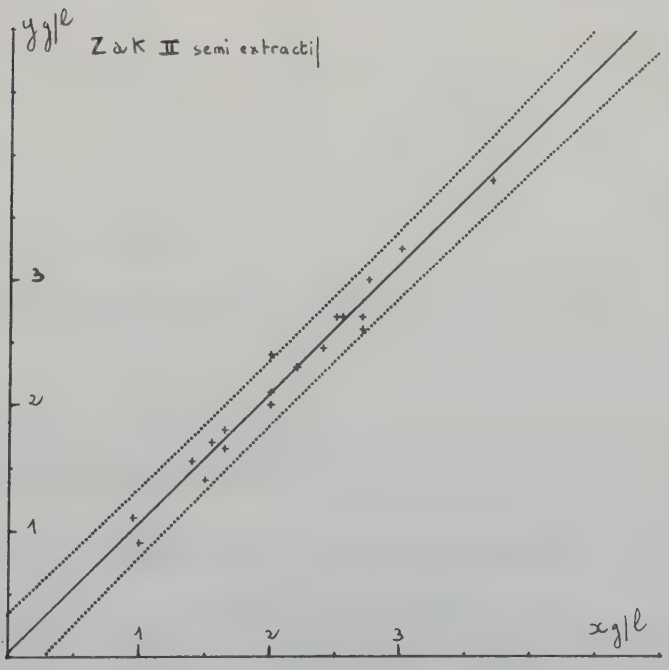


FIGURE N° 91 : Corrélation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (x) et la méthode semi - extractive de Zak II.

- d'autre part, la présence de bilirubine à des taux souvent très élevés interdit la mise en œuvre d'un protocole direct. Il faut faire appel à une méthode semi-extractive : la méthode de ZAK selon ce protocole a d'ailleurs été utilisée par JORDAN (76).

Le cholestérol ne constitue pas bien sûr un élément diagnostic majeur en pathologie néo-natale mais dans un but de dépistage des hypercholestérolémies familiales, il peut être intéressant de le doser. Dans ce cas précis, la fluorimétrie apparaît comme une méthode de choix : c'est une ultramicrométhode, il n'y a pas d'interférence de la bilirubine comme nous le verrons ultérieurement et on peut par conséquent adopter le protocole direct.

La cholestérolémie du nouveau-né est faible : de 0,45 à 1 g/l à la naissance (59). Elle double dès les premiers jours de la vie et se stabilise de un mois à vingt ans.

Nous préconisons pour la détermination du cholestérol chez le nouveau-né le protocole fluorimétrique de ZAK I, utilisant une dilution 1/500 ou 1/1000 réalisée à partir de 5 µl de sérum. Les résultats obtenus pour quinze sérums pris au hasard des échantillons du service de néo-natale sont résumés dans le tableau n°29.

B. APPLICATION A LA DETERMINATION DU CHOLESTEROL DANS D'AUTRES MILIEUX BIOLOGIQUES.

Le haut degré de sensibilité de la réaction de ZAK I nous permet d'envisager le dosage du cholestérol dans d'autres milieux biologiques :

. le liquide céphalo-rachidien,

. le liquide amniotique,

. l'humeur aqueuse.

TABLEAU N° 29 - Cholestérol chez le nouveau-né

Echantillons	*ZAK I*	
	Méthode directe Cholestérol g/l	*Méthode semi-extractive Cholestérol g/l*
1	1,60	1,75
2	2,10	2
3	1,90	2,05
4	1,50	1,40
5	1,55	1,40
6	0,95	1
7	1	0,85
8	0,90	0,85
9	1,65	1,50
10	1,05	1
11	1,65	1,75
12	1,70	1,75
13	1,65	1,70
14	0,50	0,50
15	0,45	0,40

1. LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN.

a) Rappel des travaux antérieurs.

Les techniques décrites pour le dosage du cholestérol dans le liquide céphalo-rachidien sont peu nombreuses.

Elles comprennent toutes deux étapes principales:

1.- L'extraction du cholestérol par un solvant organique : l'éthanol (155), le couple méthanol - chloroforme (145) ou l'isopropanol (147), suivie ou non d'une séparation chromatographique (145).

2.- Le dosage proprement dit :

Il est effectué :

. soit par colorimétrie en utilisant la réaction de Zak (145). Cette méthode est longue et nécessite un volume d'échantillon important : 2 à 3 ml.

. soit par fluorimétrie (147, 155).
SOLOW (147) préconise la méthode de ZAK selon un protocole semi-extractif à partir de 100 µl de liquide céphalo-rachidien.

b) Travail personnel.

a) Protocoles opératoires.

Le dosage est réalisé en voie directe et en voie semi-extractive.

Le taux de cholestérol dans le liquide céphalo-rachidien étant très faible (3 à 5 mg/l)(147), nous proposons deux protocoles opératoires uniformisés mais différents de ceux décrits pour le sérum.

Le liquide céphalo-rachidien est :

- soit dilué 1/10 dans du sérum physiologique (méthode directe),
- soit extrait par de l'isopropanol dans les mêmes proportions (méthode semi-extractive).

Parallèlement, on prépare une gamme d'étalonnage. Les solutions étalons de travail sont obtenues en diluant au 1/100 dans du sérum physiologique ou dans de l'isopropanol les solutions filles (1/50) de la gamme étalon utilisée pour le sérum (celles-ci constituent la gamme d'étalonnage de la méthode de LIEBERMANN-BURCHARD).

Le protocole opératoire est le suivant : on ajoute à 5 ml de mélange de Zak I 0,50 ml pour le dosage de liquide céphalo-rachidien dilué ou extrait au 1/10, pour l'étalonnage, de chacune des solutions étalons de travail (dilution 1/5000). En voie directe la quantité d'eau introduite relativement importante, provoque un échauffement au sein du milieu réactionnel qui accélère la cinétique. Il en résulte une moins grande stabilité de la réaction, dans ce cas la lecture doit s'effectuer entre la 40ème et la 45ème minute très exactement.

b) Résultats.

Nous avons dosé le cholestérol dans 31 liquides céphalo-rachidiens pris au hasard des échantillons hospitaliers. Pour 12 d'entre eux nous avons déterminé parallèlement les taux de protéines, chlorures et glucose. Les résultats sont consignés dans le tableau n°30.

Ce tableau appelle les commentaires suivants :

1°) Aux erreurs d'expérience près les deux protocoles donnent des résultats identiques. Il semble donc souhaitable de simplifier encore le protocole analytique: sans dilution préalable 50µl de liquide céphalo-rachidien sont ajoutés à 5 ml de mélange réactionnel et la lecture est effectuée au bout de 60 minutes. On supprime ainsi d'une part la dilution préalable, d'autre part l'échauffement. Parallèlement l'étalonnage est également simplifié : les solutions mères sont diluées au 1/500 dans du sérum physiologique et utilisées dans les mêmes conditions que le liquide céphalo-rachidien.

2°) Sur le plan physiopathologique, nous n'avons pas bénéficié des éléments cliniques nous permettant de discuter ces résultats. Cependant, à partir des 12 cas où nous avons déterminé les taux de protéines, chlorures et glucose, il semble bien qu'à une augmentation de la protéinorachie

TABLEAU N° 30 - Cholestérol dans le liquide céphalo-rachidien

L.C.R.	Protéine g/l	Chlorures g/l	Glucose g/l	ZAK I	
				Méthode directe	Méthod semi-extract
				cholestérol en mg.	
1	3,25	6,55	0,39	50	54
2	0,54	5,90	0,87	8,10	7,80
3	0,19	6,50	0,62	3	2,80
4	1,18	7,72	0,38	23	25
5	0,92	5,75	0,95	11,20	12,60
6	0,61	7,33	0,72	8,80	8,2
7	0,19	7,35	0,66	3,40	3,8
8	0,32	7,60	0,79	4,5	5
9	0,34	6,55	0,81	5,60	6,4
10	0,50	7,38	0,73	4	4
11	0,56	7,25	0,69	6	7
12	0,34	7,78	0,63	7	7,5
13				5	5,50
14				6,80	6,50
15				12	11
16				35	32
17				12	11
18				10	9
19				3	2,5
20				3	2,5

TABLEAU N° 30 (suite)

L.C.R.	Peotéine g/l	Chlorures g/l	Glucose g/l	ZAK I	
				Méthode directe	Méthode semi-extractive
				Cholestérol en mg/l	
21				25	21
22				6	6
23				5	4,50
24				11,5	9
25				4,50	5
26				4	4,50
27				5,5	5
28				29	27
29				36	34
30				38	34
31				80	80

corresponde un taux de cholestérol nettement élevé. La moyenne des patients dont la protéinorachie est inférieure à 0,60 g/l est en effet de 5,6 mg/l (méthode directe) alors que les trois cas où celle-ci est supérieure à 0,60 g/l, correspondent respectivement 50, 23, et 11,20 mg/l de cholestérol. Bien entendu, nous nous garderons de tirer des conclusions définitives mais nous nous proposons de poursuivre ces investigations.

2. *LIQUIDE AMNIOTIQUE.*

a) *Rappel des travaux antérieurs.*

Peu de travaux sont consacrés au cholestérol du liquide amniotique. Deux technologies sont décrites :

- un dosage colorimétrique sur autoanalyseur technicon par la réaction de Liebermann - Burchard (111, 71),
- un dosage en chromatographie phase gazeuse après saponification éthanolique et extraction par l'hexane (115).

Le taux de cholestérol dans le liquide amniotique est compris selon les auteurs et la technique utilisée:

- entre 20 et 600 mg/l pour les méthodes colorimétriques selon NATELSON (111),
- entre 5 et 46 mg/l en chromatographie phase gazeuse selon OWEN (155). Il n'existe aucune relation entre le taux de cholestérol du liquide amniotique et l'âge de la gestation ni avec le taux de cholestérol sérique de la mère (115). Il semble donc que le cholestérol ne soit pas un paramètre utile pour apprécier la maturité fœtale.

b) *Travail personnel.*

- *Protocole opératoire.*

Malgré le peu d'intérêt a priori du cholestérol dans le liquide amniotique, nous avons essayé de proposer une méthode de dosage de ce paramètre en fluorimétrie selon un protocole simple et rapide.

Ce protocole est identique à celui décrit pour le sérum, à savoir l'addition de 0,10 ml d'échantillon convenablement dilué à 5 ml de mélange de Zak I. Comme pour le sérum et le liquide céphalo-rachidien, nous avons effectué ce dosage en voie directe et en voie semi-extractive. Après centrifugation du liquide amniotique, on réalise une double dilution ou extraction au 1/10 et au 1/50 de telle sorte que l'une d'entre-elles puisse entrer directement dans la gamme d'étalonnage. Celle-ci est préparée dans les mêmes conditions que pour la détermination du cholestérol sérique. En conséquence, les résultats obtenus doivent être divisés par 100 (dilution 1/10) ou par 20 (dilution 1/50).

- *Résultats.*

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 31.

Là encore, méthode extractive et méthode directe sont en parfaite corrélation. Nos résultats encore trop fragmentaires sont cependant en excellente concordance avec ceux obtenus par OWEN en chromatographie phase gazeuse. Par contre, nous sommes assez éloignés des taux annoncés par WOLF et NATELSON pour lesquels la valeur moyenne est de 196 ± 102 mg/l. Ce résultat n'est pas surprenant car la technique utilisée par ces auteurs nous paraît grandement sujette à caution. Il s'agit en effet d'une technique SMA classique dont les résultats sont excellents pour la détermination du cholestérol sérique total mais dont on peut craindre le manque de sensibilité lorsqu'il s'agit du liquide amniotique pour lequel la concentration en cholestérol est approximativement le 1/100 de celle du sérum.

3. HUMEUR AQUEUSE.

Nous n'avons trouvé aucune référence concernant une étude du cholestérol dans l'humeur aqueuse.

Des déterminations effectuées sur dix humeurs aqueuses en voie semi-extractive selon le protocole opératoire précédent et à partir d'un échantillon au 1/2, 1/10 et 1/50 (pour écarter un phénomène de quenching éventuel) ont été négatives. Il semble donc qu'il n'existe pas de cholestérol dans l'humeur aqueuse.

TABLEAU N° 31 - Cholestérol dans le liquide amniotique

Liquide amniotique	*ZAK I*	
	Méthode directe (mg/l)	*Méthode semi-extractive (mg/l)*
1	15,5	16,5
2	13	14
3	75	73
4	13	14,5
5	9,5	9,5
6	100	100
7	33	29
8	42	40
9	11	12
10	13	14
11	24,5	27
12	23	21
13	8,5	9,5
14	11,5	10
15	11,5	11
16	57	60
17	14,5	14
18	18	17,5
19	11,50	11
20	10,50	10

CHAPITRE II

LIMITES DE SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE FLUORIMÉTRIQUE : ÉTUDE DES ÉVENTUELLES INTERFÉRENCES

Nous avons essayé de préciser certaines limites de spécificité de la fluorescence développée par le cholestérol en étudiant le comportement dans les divers mélanges réactionnels proposés :

1.- d'une part, de quelques stéroïdes présents dans les liquides biologiques étudiés,

2.- d'autre part, de la bilirubine qui, comme nous l'avons vu, est la source d'un surdosage important dans les méthodes colorimétriques directes et plus particulièrement dans la réaction de Liebermann-Burchard.

Dans le sérum, pour les quatre types de réactions, nous avons tenu compte de la dilution utilisée :

- 1/50 pour la méthode de LIEBERMANN-BURCHARD,
- 1/100 pour la méthode de SALKOWSKI,
- 1/500 pour la méthode de ZAK II,
- 1/1000 pour la méthode de ZAK I.

Dans le liquide céphalo-rachidien et le liquide amniotique, nous avons tenu compte de la dilution utilisée et des conditions opératoires de la réaction de Zak I :

- liquide céphalorachidien au 1/10 et 0,50 ml de prise d'essai,
- liquide amniotique au 1/10 et 0,10 ml de prise d'essai.

1. INFLUENCE DES STEROIDES.

Nous avons étudié :

- parmi les acides biliaires : l'acide cholique,
- parmi les stéroïdes hormonaux : l'œstrone, le cortisol, la testostérone.

- *SERUM :*

Pour chacun de ces métabolites, nous avons retenu un essai avec une concentration physiologique et un ou plusieurs essais avec des concentrations nettement supérieures à la normale :

- Acide cholique : 5 et 50 mg/l.
- Œstrone : 0,1 et 0,1 mg/l.
- Cortisol : 0,1 et 0,5 mg/l.
- Testostérone : 0,1 et 0,5 mg/l.

Pour les quatre protocoles étudiés (LIEBERMANN-BURCHARD, SALKOWSKI, ZAK II et ZAK I) aucune fluorescence n'a été décelée.

- *LIQUIDE AMNIOTIQUE :*

La composition qualitative et quantitative en stéroïdes hormonaux du liquide amniotique est, à l'heure actuelle, bien connue (10, 87, 140). Dans les conditions opératoires choisies, il n'y a aucune interférence de l'œstrone jusqu'à 4 mg/l, du cortisol et du pregnandiol jusqu'à 5 mg/l et de l'androstérone jusqu'à 10 mg/l. Ces concentrations sont, suivant le stéroïde considéré, 4 à 20 fois supérieurs aux taux physiologiques annoncés par les différents auteurs. On peut par ailleurs pour cette même réaction (ZAK I) appliquer ces résultats au sérum : compte tenu de la dilution utilisée dans ce cas (1/1000), des concentrations respectivement égales à 400 mg/l d'œstrone, 500 mg/l de cortisol et de pregnandiol, 1 g/l d'androstérone, ne développeraient aucune fluorescence.

- *LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN :*

Avec le protocole opératoire que nous proposons (0,50 ml de prise d'essai), il n'y a pas d'interférence de l'acide cholique jusqu'à 5 mg/l, de l'œstrone jusqu'à 500 mg/l, de cortisol et d'androstérone jusqu'à 1 mg/l.

On peut donc conclure que la fluorescence développée dans les différents mélanges réactionnels est bien spécifique du cholestérol.

2. *INFLUENCE DE LA BILIRUBINE.*

Nous avons étudié le comportement de la bilirubine:

- en solution pure en milieu albumineux (bilirubine DADE),
- après surcharge d'un sérum non ictérique,
- dans des sérums ictériques.

α) *TRAVAIL EXPERIMENTAL.*

1. En solution pure :

Les concentrations varient de 50 à 400 mg/l.

Il faut distinguer les résultats obtenus :

a) avec le mélange de Ferro,

b) avec les mélanges de Salkowski et de Zak.

- *Mélange de FERRO.*

La fluorescence est nulle pour des concentrations inférieures à 150 mg/l.

A partir de 200 mg/l, la bilirubine développe une fluorescence faible dont l'intensité augmente avec le temps. Pour le mélange B_2', l'équivalence en cholestérol au bout de 15 et 30 minutes est respectivement de :

- 0,10 et 0,20 g/l pour 200 mg/l de bilirubine,
- 0,20 et 0,50 g/l pour 400 mg/l de bilirubine.

Nous avons confirmé à plusieurs reprises ces résultats tant sur le plan cinétique que sur le plan quantitatif. On constate donc que le surdosage est très nettement inférieur à celui observé dans la méthode colorimétrique classique (λ max = 615 nm).

- *Mélanges de SALKOWSKI et ZAK :*

La bilirubine ne développe aucune fluorescence jusqu'à 1 g/l dans le mélange de Salkowski et de Zak II, jusqu'à 10 g/l dans le mélange de Zak I.

Nous avons confronté les taux de cholestérol obtenus en voie directe et en voie semi-extractive :

- avec des sérums surchargés de façon importante en bilirubine,
- avec des sérums ictériques.

2. *Après surcharge.*

Le tableau n°32 résume les résultats obtenus.

Quel que soit le mélange réactionnel considéré, il existe une parfaite concordance entre les méthodes directes et les méthodes semi-extractives. La bilirubine introduite artificiellement dans un sérum n'apporte aucune interférence.

3. *Sérums ictériques.*

Parallèlement au dosage fluorimétrique, nous avons réalisé un dosage en colorimétrie par voie directe et semi-extractive sur extrait chloroformique selon la méthode de FERRO.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux n° 33, 34 et 35.

β) *DISCUSSION DES RESULTATS.*

a) *Méthodes de SALKOWSKI et de ZAK (tableaux n°34 et 35).*

Les résultats obtenus pour ces méthodes montrent que la bilirubine n'interfère pas dans les protocoles directs : aux erreurs de manipulation près en effet, les taux de cholestérol fournis par la méthode fluorimétrique en voie directe sont comparables à ceux fournis par la méthode colorimétrique pratiquée sur extrait chloroformique et la méthode fluorimétrique réalisée sur extrait isopropanolique.

Ces résultats sont également en complète conformité avec les données théoriques que nous avons précisé au début de ce paragraphe.

TABLEAU N° 32 - Résultats obtenus pour trois sérums surchargés en bilirubine

Cholestérol g/l	*Surcharge en bilirubine mg/l*	*FERRO*		*SALKOWSKI*		*ZAK II*		*ZAK I*	
		Direct	*Semi-extractif*	*Direct*	*Semi-extractif*	*Direct*	*Semi-extractif*	*Direct*	*Semi-*
2	0	2	2	2	1,95	1,90	1,80	1,90	2
	100	2,10	2	2,10	1,90	1,80	1,80	1,75	1,
1,80	0	1,90	1,90	1,95	2,10	2	1,90	1,90	1,
	200	1,80	1,75	1,90	2	1,90	1,60	1,80	1,
	400	1,90	1,75	2	1,80	2	1,80	1,90	1,
3,40	0	3,40	3,30	3,50	3,40	3,60	3,40	3,40	3,
	200	3,40	3,50	3,60	3,50	3,65	3,50	3,50	3,

b) Méthode de FERRO (tableau n°33).

On constate que pour des sérums renfermant des taux de bilirubine inférieurs à 200 mg/l, l'interférence de la bilirubine est nulle.

Pour les cinq sérums étudiés contenant des taux élevés de bilirubine, les résultats obtenus ne sont pas homogènes :

- pour les sérums 5 et 8, le protocole direct conduit à des résultats identiques à ceux fournis par le protocole semi-extractif,
- pour les sérums 1, 4, 9, la présence de bilirubine s'accompagne d'un surdosage du cholestérol mais il est impossible de le chiffrer sur trois exemples.

Il ne semble pas que l'interférence puisse être attribuée à l'une ou l'autre forme de bilirubine, bilirubine directe ou indirecte, comme pourraient le laisser supposer les expériences par surcharge : en effet, les surdosages apparaissent dans le sérum 1 dont le taux de bilirubine directe est pratiquement nul, et dans les sérums 4 et 9 riches en bilirubine directe.

Malgré une interférence de la bilirubine beaucoup plus faible en fluorimétrie qu'en colorimétrie, lorsqu'on utilise la réaction de FERRO, le dosage du cholestérol par cette réaction dans son option fluorescence doit être obligatoirement réalisé en voie semi-extractive.

--oOo--

TABLEAU N° 33 - Influence de la bilirubine - Méthode de Ferro

	BILIRUBINE mg/l		*COLORIMETRIE FERRO*		*FLUORIMETRIE FERRO*	
	Totale	*Directe*	*D*	*E*	*D*	*E*
1	200	10	2,30	0,95	1,40	1
2	40	8	1,90	1,20	1,30	1,10
3	60	30	1,70	1,40	1,30	1,30
4	300	255	2,65	0,95	1,50	1,10
5	320	260	3,20	1,60	1,75	1,60
6	465	385	3,55	0,95	1,70	1
7	37	25	1,80	1,50	1,50	1,40
8	320	285	3	1	1,10	0,95
9	530	425	3,90	0,90	1,85	0,90
10	110	80	2,60	2	2,20	2,10

TABLEAU N° 34 - Influence de la bilirubine - Méthode de Salkowski

BILIRUBINE TOTALE mg/l	*COLORIMETRIE FERRO*		*FLUORIMETRIE SALKOWSKI*	
	D	*E*	*D*	*E*
115	2,50	1,70	1,85	1,75
30	1,95	1,90	1,90	1,85
200	2,30	0,90	1,10	1
195	3,80	2,50	2,70	2,50
200	11,20	10	9,80	10,20
110	1,85	1,20	1,30	1,15
65	2,80	2,30	2,45	2,35
80	3,25	2,60	2,70	2,80
240	12,30	10,50	10,30	9,80
60	2,30	1,80	1,90	1,85
115	1,70	1	1	1

TABLEAU N° 35 - Influence de la bilirubine
Méthodes de Zak I et Zak II

BILIRUBINE TOTALE mg/l	*COLORIMETRIE FERRO*		*FLUORIMETRIE*			
			ZAK I		*ZAK II*	
	D	*E*	*D*	*E*	*D*	*E*
200	2,30	1	1,10	1,10	1,10	1
37	1,10	0,90	0,95	0,95	1,05	0,9
100	1,80	1,30	1,25	1,10	1,30	1,1
50	1,85	1,55	1,45	1,40	1,55	1,35
250	3,60	2	2,20	1,95	2,30	2

C O N C L U S I O N

I. La détermination du cholestérol sérique constitue depuis fort longtemps l'un des examens les plus fondamentaux pour l'étude et la classification des dyslipoprotéinémies. Malgré le nombre et le volume des travaux qui lui ont été consacrés, le sujet est encore loin d'être épuisé.
A côté des méthodes colorimétriques classiques dérivant plus ou moins directement des trois réactions suivantes :

1. Réaction de Liebermann-Burchard,
2. Réaction de "Salkowski-Zak",
3. Réaction de Tschugaeff.

On a vu apparaître récemment, les méthodes enzymatiques. L'utilisation des deux premières réactions colorées par une détection spectrofluorimétrique a aussi fait l'objet de quelques essais.

Nos recherches ont porté essentiellement, dans le cas de la réaction Lebermann-Burchard appliquée en photocolorimétrie, sur l'étude des solvants utilisables, sur le rôle éventuel d'acides arylsulfoniques souvent présents dans le mélange réactionnel, sur l'interférence de la bilirubine.
Nous avons également étendu ces recherches à l'étude des possibilités de la spectrofluorescence appliquée aux réactions de Liebermann-Burchard et de Salkowski-Zak.

II. Parmi les solvants étudiés, les solvants chlorés (chloroforme, dichlorométhane et dichloroéthane) ont un comportement parfaitement "neutre" vis à vis de la réaction colorée aussi bien sur le plan qualitatif (aspects spectral et cinétique) que sur le plan quantitatif (aspect sensibilité) ; ils n'exercent qu'un effet de dilution. Cette inertie nous a permis de préciser :

1. L'influence des deux composants fondamentaux de la réaction (acide sulfurique et anhydride acétique) sur l'allure spectrale, la cinétique et la sensibilité.

2. L'interprétation théorique des différentes étapes de la réaction Liebermann-Burchard.

Les solvants hydroxylés réagissent au contraire avec l'anhydride acétique constituant ainsi un facteur surnuméraire dans le développement de la réaction colorée. L'étude systématique de la série linéaire des monoalcools, celle de différents diols et triol ainsi que d'alcools cyclaniques ou aromatique nous a permis de dégager l'influence sur la cinétique et la sensibilité de la réaction ainsi que les conditions limites d'utilisation de chacun d'entre-eux.
Sur le plan pratique, nous estimons que les solvants chlorés présentent d'indiscutables avantages sur tous les autres solvants.

III. Notre étude comparative réalisée avec divers acides arylsulfonique (acides paratoluène-sulfonique, diméthylbenzène sulfonique, sulfosalicylique) et en leur absence, conduit à des résultats tout à fait identiques tant sur le plan qualitatif (aspects spectral et cinétique) que sur le plan quantitatif (aspect sensibilité). Nous démontrons ainsi que le rôle attribuable à ces dérivés est celui d'un catalyseur protonique dont l'intérêt pratique est nul puisque tous les mélanges réactionnels comportent de l'acide sulfurique qui remplit déjà cette fonction.
Nous estimons l'adjonction de telles substances parfaitement inutile et nous souhaitons que l'appellation de méthode à "l'acide arylsulfonique X" soit définitivement abandonnée.

IV. L'étude théorique du comportement spectrophotométrique du cholestérol et de la bilirubine, d'une part dans le mélange réactionnel propre au développement de la réaction colorée, d'autre part dans divers mélanges réactionnels différents du précédent, nous a permis de proposer trois protocoles expérimentaux permettant de corriger l'interférence de la bilirubine sur la détermination par une méthode directe de la cholestérolémie.
Le premier protocole est une méthode par correction graphique utilisant le mélange réactionnel classique avec lecture à deux longueurs d'ondes. Une équation simple du premier degré à deux inconnues conduit à une densité optique corrigée. Nous avons précisé les limites d'application de ce type de correction.
Le second protocole est une méthode de correction par blanc. Elle comporte le développement parallèle de la réaction colorée dans le mélange réactionnel classique et dans un mélange réactionnel différent. Il y a alors dissociation du comportement du cholestérol qui ne réagit plus dans le second mélange. La bilirubine au contraire a un comportement très voisin dans les deux mélanges considérés. Nous avons également précisé le domaine d'application d'une telle correction par blanc.
Le troisième protocole est une méthode de correction par équivalence. Elle nécessite la détermination du taux de bilirubine sérique et l'utilisation d'un facteur d'équivalence tiré de notre étude théorique par spectrophotocolorimétrie.

L'application pratique de ces trois protocoles à une série de sérums provenant de patients ictériques démontre statistiquement la supériorité de la correction par blanc sur les deux autres protocoles.

V. L'étude théorique des réactions de Liebermann-Burchard, Salkowski et Zak utilisées en spectrofluorescence, montre une similitude de comportement spectral des trois réactions (λ max d'excitation 470 nm, λ max d'émission 505 nm). L'interprétation théorique de ce résultat correspond à l'évaluation du cation triénylique.

Le facteur température modifie considérablement le comportement spectral dans la réaction de Zak. (λ max d'excitation 525 nm ; λ max d'émission 565 nm). L'interprétation théorique de ce résultat est la formation préférentielle du cation tétraénylique.

L'étude de l'influence de différents facteurs (concentrations en acide sulfurique, anhydride acétique, ions ferriques, nature du solvant) sur la cinétique et la sensibilité de la réaction, nous a permis de préciser les conditions optima d'utilisation de la spectrofluorescence. Une étude complémentaire d'une part de la fluorescence en fonction de la concentration, d'autre part d'une série de substances susceptibles d'interférer (structures à noyau stéroïdien et bilirubine) fixe les limites d'utilisation sur le plan de la sensibilité et de la spécificité.
Nous avons également démontré que divers esters physiologiques (oléate, linoléate, linolénate, palmitate et stéarate de cholestéryle) ont, à molarité identique, un comportement semblable à celui du cholestérol.

VI. Nous avons appliqué ces données théoriques à la détermination par spectrofluorescence du cholestérol dans divers milieux biologiques (sérum, liquide céphalo-rachidien, liquide amniotique) selon un protocole direct et un protocole semi-extractif : les résultats obtenus par ces deux voies sont tout à fait comparables.
Dans le cas particulier du sérum, quelle que soit la réaction utilisée (réactions de Liebermann-Burchard, de Salkowski, de Zak) l'exploitation statistique des résultats fait apparaître une excellente corrélation avec la méthode colorimétrique de FERRO et HAM ($r = 0,98$).
Cette méthode extrêmement sensible, très simple, et d'une bonne spécificité nous paraît mériter une place intéressante parmi les méthodes de dosage du cholestérol.

--oOo--

B I B L I O G R A P H E

1. ABELL L.L., LEVY B.B., BRODIE B.B., KENDALL F.E.-
A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity.
J. Biol. Chem., 1952, 195, 357 - 366.

2. ALBERS R.W., LOWRY O.H.-
Fluorometric determination of 0,1 to 10 micrograms of cholesterol.
Anal. Chem., 1955, 27, 11, 1829 - 1831.

3. ALLAIN C.C., POON L.S., CHAN C.S., RICHMOND W., FU P.C.-
Enzymatic determination of total serum cholesterol.
Clin. Chem., 1974, 20, 470 - 475.

4. AMBERT J.P., CAHOUR A., HARTMANN L.-
Dosage en deux temps du cholestérol total et du cholestérol libre plasmatique par chromatographie gaz - liquide. Proposition d'une méthode de référence.
Clin. Chim. Acta, 1976, 68, 31 - 41.

5. ANDERSON J., KEYS A. -
Cholesterol in serum and lipoprotein fractions.
Clin. Chem., 1956, 2, 145.

6. ASSOUS E.F., GIRARD M.L. -
Micromethode nouvelle de dosage du cholestérol libre et du cholestérol total directement sur le sérum sanguin.
Ann. Biol. Clin., 1962, 20, 10 - 12, 973 - 986.

7. BABSON A.L., SHAPIRO P.O., PHILLIPS G.E. -
A new assay for cholesterol and cholesterol esters in serum which is not affected by bilirubin.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 800 - 804.

8. BADZIO T. -
The determination of cholesterol in serum using $FeCl_3$ reagent without increasing temperature.
Chem. Anal., 1967, 12, 3 - 8.

9. BADZIO T., WINNICKA U., SOLECKI A. -
Fluorimetric microdetermination of cholestérol
Z. Anal. Chem., 1976, 200, 701 - 705.

10. BAIRD C.W., BUSH I.E. -
Cortisol and Cortison content of amniotic fluid from diabetic and non diabetic women.
Acta Endrocrinol., 1960, 34, 97 - 104.

11. BILLIMORA J.D., JAMES D.C.O. -
Twe improved methods for serum cholesterol estimation.
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 644 - 651.

12. BJÖRKHEM I., BLOMSTRAND R., SVENSSON L. -
Serum cholesterol determination by mass fragmentography.
Clin. Chim. Acta., 1974, 54, 185 - 193.

13. BJÖRNTORP P., CRAMER K. -
Influence of cholesteryl esters from human serum on serum determination with the modified Theorell method.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, 13, 434 - 438.

14. BLOCK W.D., JARRETT K.J., LEVINE J.B. -
An improved automated determination of serum total cholesterol with a single color reagent.
Clin. Chem., 1966, 12, 10, 681 - 689.

15. BLOOR W.R. -
The determination of cholesterol in blood.
J. Biol. Chem., 1916, 24, 227.

16. BONDJERS G., BJÖRKERUD S. -
Fluorometric determination of cholesterol and cholesteryl ester in tissue on the nanogram level.
Anal. Biochem., 1971, 42, 363 - 371.

17. BORGSTROM B. -
Effect of taurocholic acid on the pH activity curve of rat pancreatic lipase.
Biochim. Biophys. Acta., 1954, 13, 149 - 150.

18. BOUTWELL J.H. -
Serum cholesterol.
Clin. Chem., 1964, 10, 11, 1039 - 1049.

19. BOWMAN R.E., WOLF R.C. -
A rapid and specific ultramicromethod for total serum cholesterol.
Clin. Chem., 1962, 8, 3, 302 - 309.

20. BRIESKORN C.H., CAPUANO L. -
Color reaction with triterpenes and sterols.
Chem. Ber., 1953, 86, 866.

21. BRIESKORN C.H., HOFMANN H. -
Beitrag zum Chemismus der Farbreaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD.
Arch. Pharm., 1964, 37, 297.

22. BURCHARD H. -
Beiträge zur kenntnis des cholesterins.
Chem. Zentr. B., 1890, 61, 1, 25 - 27.

23. BURKE R.W., DIAMONDSTONE B.I., VELAPOLDI R.A., MENIS O.-
Mechanisms of the LIEBERMANN-BURCHARD and ZAK color reactions for cholesterol.
Clin. Chem., 1974, 20, 7, 794 - 797.

24. CARPENTER K.J., GOTSIS A., HEGSTED D.M. -
Estimation of total cholesterol in serum by a micromethod.
Clin. Chem., 1957, 3, 233 - 238.

25. CAVANAUGH D.J., GLICK D. -
Determination of cholesterol in microgram quantities of tissue.
Anal. Chem., 1952, 24, 1839 - 1841.

26. CAWLEY L.P., MUSSER B.O., CAMPBELL S., FAUCETTE W. -
Analysis of total serum cholesterol by means of gaz - liquid chromatography.
Am. J. Clin. Path., 1963, 39, 5, 450 - 455.

27. CHIAMORI N., HENRY R. -
Study of the ferric chloride method for determination of total cholesterol and cholesterol esters.
Amer. J. Clin. Path., 1959, 31, 4, 305 - 309.

28. CLARK L.C., EMORY C.R. -
The measurement of cholesterol and its esters using polarographic anodic enzyme electrod in Ion and Enzyme electrodes in Biologie and Medecine.
URBAN - SCHWARZENBERG. München, 1976, 161 - 172.

29. COLLINS R.A. -
A comparaison of the abell and modified ferric chloride total cholesterol methods.
Amer. J. Clin. Path ., 1970, 34, 219 - 225.

30. COSTELLO R.L., CURRAN G.L. -
Modified turbidimetric procedure for determination of cholesterol.
Am. J. Clin. Path., 1957, 27, 108.

31. CRAMER K., ISAKSSON B. -
An evaluation of the Theorell method for the determination of serum cholesterol.
Scand. J. Clin. Lab. Invest ., 1959, 11, 213 - 216.

32. CRAWFORD N. -
An improved method for the determiantion of free and total cholesterol using the ferric chloride reaction.
Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 357 - 367.

33. CROCKETT R. -
Comportement du cholesterol et de quelques uns de ses esters vis-à-vis de diverses réactions colorées.
Bull. Soc. Pharm. Montpellier, 1964, 23, 178 - 199.

34. CROCKETT R., DALLOCHIO M., BROUSTET J.P., SAGARDILUZ J., BRICAUD H. -
Comparaison des résultats du dosage du cholestérol total par diverses méthodes appliquées directement au sérum et après extraction. Intérêt de la méthode de FERRO et HAM.
Arch. des Mal. Coeur - Vaisseaux, Revue de l'Athérosclérose, 1963, suppl. N°2, 55 - 87.

35. CROCKETT R., GRENIÉ D., FOURTILLAN J.B. -
Travail non publié.

36. DEBOT M.P. -
Sur le dosage du cholestérol sérique. (Essai d'une méthode colorimétrique directe).
J. Méd. Bordeaux, 1960, 137, 253 - 259.

37. DELSAL J.L. -
Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le METHYLAL. Applications aux microdosages du cholestérol total, des phospho-amino-lipides et des protéines.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 99 - 105.

38. DIETSCHY J.M., WEEKS L.E., DELENTE J.J. -
Enzymatic measurement of free and esterified cholesterol levels in plasma and other biological preparations using the oxygen electrode in a modified glucose analyser.
Clin. Chim. Acta, 1976, 73, 407 - 414.

39. DREZGA Z., MIKAC - DEVIC D. -
Evaluation of some methods for serum total cholesterol.
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 317 - 321.

40. DRISCOLL J.L., AUBUCHON D., DESCOTEAUX M., MARTIN M.F.-
Semi-automated specific routine serum cholesterol determination by gas-lipuid chromatography.
Anal. Chem., 1971, 43, 10, 1196 -1200.

41. DULOU R., CHOPIN J., RAOUL Y. -
Structure de deux bicholestadienes isolés de la réaction de SALKOWSKI sur le cholestérol.
Bull. Soc. Chim. de France, 1951, 616 - 621.

42. DUMAZERT. -
Communication personnelle.

43. FENG H., PI C., WANG R., CHEN L. -
Use of ferric ammonium sulfate in serum cholesterol determination.
Clin. Chem., 1973, 19, 1, 121 - 122.

44. FERRO P.V., HAM A.B. -
Rapid determination of total and free cholesterol in serum.
Am. Clin. J. Path., 1960, 33, 6, 545 - 549.

45. FLACK J.D., STOCKMAN M.A. -
The fluorimetric assay of corticosterone in the presence of cholesterol background.
Anal. Biochem., 1969, 27, 47 - 57.

46. FLEGG H.M. -
An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method.
Ann. Clin. Biochem., 1973, 10, 79 - 84.

47. FLEROV M.A., ALEKSEENKO V.P., PROKHOROVA M.I. -
Diagnostic test of cholesterol esters IR spectra of plasma.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972, 29, suppl. 126.

48. FORBES. -
Determination of cholesterol in blood plasma and serum.
J. Lab. Clin. Med., 1930, 16, 520 - 521.

49. FRANEY R.J., AMADOR R. -
Serum cholesterol measurement based on ethanol extraction and ferric chloride sulfuric acid.
Clin. Chim. Acta., 1968, 21, 255 - 263.

50. FRUCHART J. C., BUASSA-BY-TSUMBU, DE WAILLY, SEZILLE G., JAILLARD J. -
Automatisation en fluorimétrie du dosage enzymatique du cholestérol libre et total. Application à la détermination du rapport d'estérification.
Ann. Biol. Clin., 1975, 33, 453- 457.

51. GIRARD M.L. -
Possibilités actuelles d'exploration biologique du Foie dans : Problèmes actuels de Biochimie appliquée.
Masson éd. 4ème série - 1972.

52. GOODMANN D.S., SHIRATORI T. -
Fatty acid composition of human plasma lipoproteins fractions.
J. Lip. Res., 1964, 5, 307 - 313.

53. GRIGAUT A. -
C.R. Soc. Biol., 1910, 68, 791.

54. GUY J., DELTOUR G.H., WEINMANN S.H. -
Dosage du cholestérol dans le sérum sanguin par spectrophotométrie infrarouge.
Ann. Biol. Clin., 1955, 1-2, 43-48.

55. HAECKEL R., PERLICK M. -
A new enzymatic determination of cholesterol. The use of aldehyde deshydrogenase to mesure H_2O_2 producing reactions.
J. Clin. Chem.Clin.Biochem.,1976,14,8, 411-414.

56. HAM A.B. -
A method of cholesterol determination employing the ferric chloride reaction.
Am. J. Med. Techn., 1966, 32, 3,182 - 186.

57. HANAHAN D.J., WATTS R.M., PAPPOJOHN D. -
Some chemical characteristics of the lipids of human and bovin erythrocytes and plasma.
J. Lip. Res., 1960, 1, 421 - 431.

58. HAUGE J.G., NICOLAYSEN R. -
A rapid and sensitive method for determination of total serum cholesterol
Ac. Physiol. Scand., 1958, 43, 359 - 364.

59. HENRY R.J., CANNON D.C., WINKELMAN J.W. -
Clinical Chemistry. Principles and Technics.
Harper-Row.
NEW-York, 1974, 1447.

60. HERBAIN M. -
Dosage du cholestérol sérique par colorimétrie sur le digitonoside. Améliorations opératoires en particulier dans les cas d'hyperlipidémies élevées.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 5 - 6, 821-831.

61. HERNANDEZ H.H., CHAIKOFF I.L. -
Purification and properties of pancreatic cholesterol esterase.
J. Biol. Chem., 1957, 228, 447 - 457.

62. HEWITT T.E., PARDUE H.L. -
Kinetics of the cholesterol sulfuric-acid reaction : a fast kinetic method for serum cholesterol.
Clin. Chem.,1973, 19, 10, 1128 - 1134.

63. HINDRIKS F.R., WOLTHERS B.G., GROEN A. -
The determination of total cholesterol in serum by gas liquid chromatography compared with two other methods.
Clin. Chim. Acta., 1977, 74, 207 - 215.

64. HOLMGARD A. -
A note on the determiantion of serum cholesterol by the LIEBERMANN-BURCHARD reaction.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1957, 9, 99- 100.

65. HOLUB W., GALLI F. -
Automated direct method ofr measurement of serum cholesterol with use of primary standards and a stable reagent.
Clin. Chem., 1972, 18, 239 - 243.

66. HOPKINS F.G., COLE S.W. -
On the proteid preaction of ADAMKIEWICZ with contributions to the chemistry of glyoxylic acid.
Proc. Roy. Soc., Lond., 1901, 68, 21 - 33.

67. HOUSSET E., MIKOL C. -
Premiers essais de dosage du cholestérol total par un détergent anionique.
Ann. Biol. Clin., 1957. 15, 343.

68. HUANG T., CHEN C., WEFLER V., RAFTERY A. -
A stable reagent for the LIEBERMANN-BURCHARD Reaction.
Anal. Chem., 1961, 33, 1405 - 1407.

69. HUANG H.S., KUAN J.C.W., GUILBAULT G.G. -
Fluorometric enzymatic determiantion of total cholesterol in serum.
Clin. Chem., 1975, 21, 1605 - 1608.

70. HUANG H.S., KUAN S.S., GUILBAULT G.G. -
Amperometric determination of total cholesterol in serum, with se of immobilized cholesterol ester hydrolase and cholesterol oxidase.
Clin. Chem., 1977, 23, 671 - 676.

71. HYUN J., KOTHARI H., HERM E., MORTENSON J., TREADWELL C.R., VAHOUNYG V. -
Purification and properties of pancreatic juice cholesterol esterase.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 1937 - 1945.

72. IRELAND J.T. -
The colorimetric estimation of total cholesterol in whole blood, serum, plasma and other biological material.
Biochem. J., 1941, 35, 283.

73. JAMIESON A. -
A method for the rapid determination of serum total cholesterol using a modification of the PEARSON reaction.
Clin. Chim. Acta. 1964, 10, 530 - 535.

74. JONES B.J., MORELAND F.B. -
P. Toluenesulfonic acid, cholesterol determination and explosions.
Clin. Chem., 1955, 1, 345.

75. JORDAN W.J. -
A modified total serum cholesterol method to eliminate the effect of high bilirubin levels.
Clin. Chem., 1968, 14, 1, 31- 34.

76. JORDAN W.J., KNOBLOCK E.C. -
Micromethod for total serum cholesterol that eliminates interference by high bilirubin concentrations.
Clin. Chem., 1970., 16, 1, 18 - 19.

77. JUNG D.H., PAREKH A.C. -
A new color reaction for cholesterol assay.
Clin. Chim. Acta., 1971, 35 , 73 - 78.

78. JUNG D.H., BIGGS H.G., MOOREHEAD W.R. -
Colorimetry of serum cholesterol with use of ferric acetate / uranyl acetate and ferrous sulfate / sulfuric acid reagents.
Clin. Chem., 1975, 21, 10, 1528 - 1530.

79. KABARA J.J., Mc LAUGHLIN J.T., RIEGEL C.A. -
Quantitative microdetermination of cholesterol using tomatine as a precipitating agent.
Anal., Chem., 1961., 33, 305.

80. KAGEYAMA N. -
A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system.
Clin. Chim. Acta, 1971, 31, 421 - 426.

81. KALLNER A. -
Rapid determination of serum cholesterol by a modified PEARSON method.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972, 30, 391 - 394.

82. KAMENO Y., NAKANO N., BABA S. -
Studies on a polarographic determination method of serum cholesterol.
Clin. Chim. Acta, 1977, 77, 245 - 255.

83. KATO K. -
Chem.Pharm. Bull., 1964, 12, 582.

84. KENNY A.P. -
The determination of cholesterol by the LIEBERMANN-BURCHARD reaction.
Biochem. J., 1952, 52, 611.

85. KIM E., GOLDBERG M. -
Serum cholesterol assay using a stable LIEBERMANN-BURCHARD reagent.
Clin. Chem., 1969, 15, 12, 1171 - 1179.

86. KIT CHLORAMINE T. -
Uni-tech. Chemical Manufacturing Co, 14 725, ARMINTA ST., PANORAMA CITY, Calif.
Chol. Tech. Method : Uni-Tech. Direction Brochure, pamphlet M., 104-REV., 1963.

87. KLOPPER A. -
Steroïds in Amniotic fluid.
Ann. Clin. Res., 1970, 2, 289 - 299.

88. KLUNGSÖYR L., HAUKENES E., CLOSS K. -
A method for the determination of cholesterol in blood serum.
Clin. Chim. Acta, 1958, 3, 514-518.

89. KOVAL G.J. -
Cholesterol measurements in normal and lipemic sera : elimination of an extraneous chromogen.
J. Lip. Res., 1961, 2, 419 - 420.

90. KRITCHEVSKY D. -
Cholesterol.
John Wiley and Sons, New-York, 1958, 7, 232-233.

91. LANGE W., FOLZENLOGEN R.G., KOLP D.G. -
Colorless crystalline perchloric and hexafluorophosphoric acid salts of Sterols.
J. Amer. Chem. Soc., 1949, 71, 1733.

92. LEFFLER H.H. -
Estimation of cholesterol in serum
Amer. J. Clin. Path., 1959, 31, 4, 310 - 313.

93. LEIBOFF S.L. -
The determination of total cholesterol and cholesterol esters in blood.
J. Lab. Clin. Med., 1942, 28, 219.

94. LEPPANEN V. -
Evaluation of the p. toluene-sulfonic acid for the quantitative determination of total cholesterol in serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1956, 8, 201-206.

95. LIE R.F., SCHMITZ J.M., PIERRE K.J., GOCHMAN N. -
Cholesterol oxidase-based determination, by continous flow analysis, of total and free cholesterol in serum.
Clin. Chem., 1976, 22, 1627 - 1630.

96. LIEBERMANN C. -
Ber. Dtsch. Chem. Gesellsch., 1885, 18, 1803.

97. LIFSCHUTZ J. -
Ber., 1908, 41, 252.

98. LIN S.N., HORNING E.C. -
Analysis of long-chain acids of human plasma phosphatidyl chodines (lecithins) and cholesteryl esters by glass open tubular capillary column gas chromatography for stroke patients and for normal subjects.
J. Chromatogr., 1975, 112, 483 - 497.

99. Mc DOUGAL D.B., FARMER H.S. -
A fluorometric method for total serum cholesterol.
J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 485 - 488.

100. MACGEE J., ISHIKAWA T., MILLER W., EVANS G., STEINER P., GLUECK C. -
A micromethod for analysis of total plasma cholesterol using gas liquid chromatography.
J. Lab. Clin. Med., 1973., 82, 656 - 662.

101. MAJKIĆ N., BERKÉS I. -
Determination of free and esterified cholesterol by a kinetic method.
Clin. Chim. Acta., 1977, 80, 121 - 131.

102. MANASTERKI A., ZAK B. -
Cholesterol study : reaction plateau and kinetic determination.
Microchem. J., 1974, 19, 8 - 17.

103. MANN G.V. -
A method for measurement of cholesterol in blood serum.
Clin. Chem., 1961, 7,3, 275 - 284.

104. MARTENSSON E.H. -
Investigation of factors affecting the LIEBERMANN-BURCHARD cholesterol reaction.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1963, 15,suppl. 19 164 - 180.

105. MATTSON F.H., VOLPENHEIN R.A. -
Carboxylic ester hydrolases of rat pancreatic juice.
J. Lip. Res., 1966, 7, 536 - 542.

106. MATTSON F.H., VOLPENHEIN R.A. -
Hydrolysis of primary and secondary esters of glycerol by pancreatic juice.
J. Lip. Res., 1968, 9, 79 - 84.

107. MICHÄELSSON M. -
A modified procedure for the determination of serum bilirubin in icterus of the new born infant.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1961, 13, suppl. 56, 46 - 50.

108. MOLINE C., BARRONE J. -
Effect of Bilirubin and lipemia on an automated method for serum cholesterol.
Clin. Chem., 1969, 15, 6, 521 - 526.

109. MOMSEN W.E., BROCKMAN H.L. -
Purification and characterization of cholesterol esterase from porcine pancreas.
Biochim. Biophys. Acta., 1977, 486, 103 - 113.

110. NAKA H. -
Applications of serum cholesterol determination with O-phtalaldehyde reagent to the VICKERS M 300 Automated Biochemical Analysis System.
Clin. Chim. Acta., 1972, 42, 193 - 199.

111. NATELSON S., SCOMMEGNA A., EPSTEIN M.B. -
Amniotic fluid : physiology, biochemistry and clinical chemistry.
John WILEY and sons, New-York, 1974, 68.

112. NESS A.T., PASTEWKA J.V., PEACOCK A.C. -
Evaluation of a recently reported stable LIEBERMANN - BURCHARD reagent and its use for the direct determination of serum total cholesterol
Clin. Chim. Acta., 1964, 10, 229 - 237.

113. NOMA A., NAKAYAMA K. -
Polarographic method for rapid micro-determination of cholesterol with cholesterol esterase and cholesterol oxidase.
Clin. Chem., 1976, 22, 236-340.

114. NOMA A., NAKAYAMA K. -
Comparative studies on cholesterol oxidases from different sources.
Clin. Chim. Acta., 1976, 73, 487 - 496.

115. OWEN V.M.J., HO F.K., MAZZUCHIN A., DORAN T.A., LIEDGRENS S., PORTER C.J. -
Cholesterol in amniotic fluid determined by gas chromatography.
Clin. Chem., 1976, 22, 2, 224 - 226.

116. PAPASTATHOPOULOS D.S., RECHNITZ G.A. -
Enzymatic cholesterol determination using ion selective membrane electrodes.
Anal. Chem., 1975, 47, 1792 - 1796.

117. PAREKH A.C., JUNG D.H. -
Cholesterol determination with ferric acetate uranium acetate and sulfuric acid-ferrous sulfate reagents.
Anal. Chem., 1970, 42, 12, 1423 - 1427.

118. PEARSON S., STERN S., Mc GAVACK T.H. -
A rapid accurate method for determination of total cholesterol in serum.
Anal. Chem., 1953, 25, 813.

119. PEYNET J., CANAL J., DELATTRE J., ROUSSELET F., GIRARD L -
Etude de la spécificité d'action de la cholestérol oxygène oxydo-reductase sur certains stérols et substances apparentées.
Ann. Biol. Clin., 1976, 34, 1, 19 - 26.

120. PEYNET J., CHAPPUIS P. -
Dosage du cholestérol : problèmes actuels de biochimie appliquée 8ème série. Lipides-lipoprotéines et athérosclérose.
Masson et Cie, édit., Paris, 1976.

121. POLLAK O.J., WADLER B. -
Rapid turbidimetric assay of cholesterol.
J. Lab. Clin. Med., 1952., 29, 791 - 794.

122. POSTMA T., STROES J.A.P. -
Lipid screening in clinical chemistry.
Clin. Chem., 1968, 22, 569 - 578.

123. RAPPAPORT F., EICHHORN F. -
Sulfosalicylic acid as a substitute for para toluene sulfonic acid.
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 161 - 163.

124. REHAK N.N., YOUNG D.S. -
Enzymatic determination of serum free cholesterol and cholesterol ester by Kinetic Microcalorimetry.
Clin. Chem., 1977, 23, 7, 1153.

125. REINHOLD J.G. -
The determination of blood cholesterol.
Amer. J. Clin. Path., 1936, 6, 31 - 40.

126. RICHARDSON R.W., SETCHELL K.D.R., WOODMAN D.D. -
An improved procedure for the estimation of serum cholesterol.
Clin. Chim. Acta, 1971, 31, 403 - 407.

127. RICHMOND W. -
The development of an enzymatic technique for the assay of cholesterol in biological fluids.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1972, 29, suppl. 26, abstract 3 - 25.

128. RICHMOND W. -
Preparation and properties of a cholesterol oxidase from nocardia Sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum.
Clin. Chem., 1973, 19, 1350 - 1356.

129. RICHMOND W. -
Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis.
Clin. Chem., 1976, 22, 10, 1579 - 1588.

130. RIVANO R., ALTRINETTI E., BELLUCCI P. -
Determinazione automatica a fluosso continuo del colesterolo con metodo enzimatico.
Pathologica, 1975, 67, 227 - 243.

131. ROBERTSON G., CRAMP D.G. -
An evaluation of cholesterol determination in serum and serum lipoprotein fraction by a semi-automated fluorimetric method.
J. Clin. Path., 1970, 23, 243 - 245.

132. RODA A., FESTI D., SAMA C., MAZZELLA E., ALDIW R., RODA E., BARBARA L. -
Enzymatic determination of cholesterol in bile.
Clin. Chim. Acta, 1975, 64, 337 - 341.

133. ROESCHLAU P., BERNT E., GRUBER W. -
Enzymatische bestimmung des gesamt-cholesterins im serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 1974, 12, 226 - 5.3.

134. ROSE A.R., SCHATTNER F., EXTON W.G. -
Am. J. Clin. Pathol., 1941, 5,19.

135. ROSENTHAL H.L., PFLUKE M.L., BUSCAGLIA B.S. -
A stable iron reagent for determination of cholesterol.
J. Lab. Clin. Med., 1957, 50, 2, 318 - 322.

136. RUDEL L.L., MORRIS M.D. -
Determination of cholesterol using O-phtalaldehyde.
J. Lip. Res., 1973, 14, 364 - 366.

137. RUNDE I. -
A standardized direct method for total cholesterol determination in serum with a combined reagent.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1966, 18, 461 - 466.

138. SALKOWSKI F. -
Die reaction des cholesterin mit schewefelsaure
Arch. Dtsch. Ges. Physiol., 1872, 6, 207.

139. SAX S.M., DAUGHETEE L.A. -
Study of a recently proposed iron sulfuric acid cholesterol method.
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 79 - 90.

140. SCHLINDLER A.E., RATANASOPA V. -
Profile of steroids in amniotic fluid of normal and complicated pregnancies.
Acta Endocrinol., 1968, 59, 239 - 248.

141. SCHOENHEIMER R., SPERRY W.M. -
A micromethod for the determination of free and combined cholesterol.
J. Biol. Chem., 1934, 106, 745 - 760.

142. SCHRADE W. -
Med. U. Ernähr., 1960, 1, 267.

143. SEARCY R.L., BERQSUIST L.M. -
A new color reaction for the quantification of serum cholesterol.
Clin. Chim. Acta., 1960, 5, 192 - 199.

144. SIEKMANN L., HÜSKES K.P., BREUER H. -
Determination of cholesterol in serum using mass fragmentography.
Z. Anal. Chem. 1976, 279, 2, 145-146.

145. SHIN Y.S. -
Silicic Acid Column chromatography for the microdetermination of cholesterol ester, and phospholipid from Human Cerebrospinal Fluid.
Anal. Biochem., 1963, 5, 369 - 378.

146. SOBEL C., FERNANDEZ A. -
Determination of total and esterified cholesterol in serum.
Clin. Chem., 1966, 12, 11, 739 - 747.

147. SOLOW E.B., FREEMANN L.W. -
A fluorometric ferric chloride method for determining cholesterol in cerebrospinal fluid and serum.
Clin. Chem., 1970, 16, 472 - 476.

148. SOLS A. -
Determination directa de colesterina total en suero.
R. Esp. Fisiol., 1947, 3, 3, 225 - 241.

149. SOMMERS P.B. , JATLOW P.I., SELIGSON D. -
Direct determination of total serum cholesterol by use of double wavelength spectrophotometry.
Clin. Chem., 1975, 21, 6, 703 - 707.

150. SPERRY W.M., WEEB M. -
A revision of the SCHOENHEIMER - SPERRY method for cholesterol determination.
J. Biol. Chem., 1950, 187, 97 - 106.

151. STADTMAN T.C., CHERKES A., ANFIWSEN C.B. -
Studies on the microbiological degradation of cholesterol.
J. Biol. Chem., 1953, 206, 511 - 523.

152. TARBUTTON P.N., GUNTER C.R. -
Enzymatic determination of total cholesterol in serum.
Clin. Chem., 1974, 20, 724 - 725.

153. TISHLER F., BATHISH J.N. -
Fluorometric method for determination of cholesterol in microliter quantities of blood.
J. Pharm. Sci., 1965, 54, 1786 - 1789.

154. TORRES J.F. -
Rev. Asoc. Bioquim. Argen., 1957, 22, 28.

155. TOURTELOTTE W.W., SKRENTY B.A., DEJONG R.N., ARBOR A-
A study of lipids in the cerebrospinal fluid. The determination of free and total cholesterol
J. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 197 - 206.

156. TRINDER P. -
The determination of cholesterol in serum.
Analyst, 1952, 77, 321-325.

157. TRINDER P. -
Determination of glucose in blood using glucose exidase with an alternative axygen acceptor.
Ann. Clin. Biochem., 1969, 6, 24.

158. TROY R.J., PURDY W.C. -
The coulometric determination of cholesterol in serum.
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 155 - 163.

159. TSCHUGAEFF L.A. -
Eine neue colorimetrische reaction des cholesterins.
Chem. Z., 1900, 24, 542.

160. VAHOUNY G.V., WEERSING S., TREADWELL C.R. -
Function of specific bile acids in cholesterol esterase activity in vitro.
Bioch. Biophy. Acta, 1965, 98, 607 - 616.

161. VAN BOETZELAER G.L., ZONDAG H.A. -
A rapid modification of the PEARSON reaction for total cholesterol.
Clin. Chim. Acta., 1960, 5, 943 - 944.

162. VAN GENT C.M., VAN DER VOORT H.A., DEBRUYN A.M., KLEIN F. -
Cholesterol determination a comparative study of methods with special reference to enzymatic procedures.
Clin. Chim. Acta., 1977, 75, 243 - 251.

163. VELAPOLDI R.A., DIAMONDSTONE B.I., BURKE R.W. -
Spectral interpretation and kinetic studies of the Fe^{3+}-H_2SO_4 (ZAK) procedure for determination of cholesterol.
Clin. Chem., 1974, 20, 7, 802 - 811.

164. VINCENT D., LAFFITTE F., LACROIX R. -
Le dosage direct du cholestérol sérique (d'après la méthode de RAPPAPORT-EICHORN).
Ann. Biol. Clin., 1961, 19, 165 - 168.

165. WATANABE T. -
Coloured products and intermediates of Liebermann-Burchard reaction with cholesterol ans its mechanism.
Eisei Shikenjo Hokoku, 1959, 77, 87.

166. WATSON D. -
A simple method for the determination of serum cholesterol.
Clin. Chim. Acta., 1960, 5, 637- 643.

167. WATTS R., CARTER T., TAYLOR S. -
Serum cholesterol and T. G. by gas liquid chromatography compared with a continuous flow technique.
Clin. Chem., 1976, 22, 1692.

168. WEIGENSBERG B.I., Mc MILLAN G.C. -
Ultraviolet spectrophotometric method for the determination of cholesterol.
Am. J. Clin. Path., 1959, 31, 16 - 25.

169. WINDAUS A. -
Physiol. Chem. , 1910, 65, 110.

170. WITTE D.L., BARRETT D.A., WYCOFF D.A. -
Evaluation of an enzymatic procedure for determination of serum cholesterol with the Abbott ABA-100.
Clin. Chem., 1974, 20, 1282 - 1286.

171. WOLF P.L., BLOCH D., TSUDAKA T. -
Biochemical profile of amniotic fluid to assess fetal maturity.
Clin. Chem., 1970, 16, 843 - 844.

172. WRIGHT L.A., TONKS D.G., ALLEN R.H. -
Determination of cholesterol with special reference to the use of P. Toluene sulfonic acid.
Clin. Chem., 1960, 6, 3, 243 - 253.

173. WYBENGA D.R., PILEGGI V.J., DIRSTINE P.H., DIGIORGIO J. -
Direct manual determination of serum total cholesterol with a single stable reagent.
Clin. Chem., 1970, 16, 980 - 984.

174. YONGER J., DELORME G., -
Application de la réaction de TSCHUGAEFF a un microdosage du cholesterol total et esterifié du sérum.
Ann. Biol. Clin., 1961, 19, 151 - 163.

175. ZAK B. -
Simple rapid micro-technic for serum total cholesterol.
Am. J. Clin. Pathol., 1957, 27,583 - 587.

176. ZAK B., EPSTEIN E. -
A study of several color reactions for the determination of cholesterol.
Clin. Chim. Acta., 1961, 6, 72 - 78.

177. ZAK B., WEINER L.M., WELSH B. -
Spectrometric study of bilirubin interference in the HUANG reaction for cholesterol.
Clin. Chim. Acta., 1970, 30, 697 - 705.

178. ZLATKIS A., ZAK B. -
Study of new cholesterol reagent.
Anal. Biochem., 1969, 29, 143 - 148.

179. ZLATKIS A., ZAK B., BOYLE A.J., DETROIT M.D. -
A new method for the direct determination of serum cholesterol.
J. Lab. Clin. Med., 1953, 41, 486-492.

180. ZOPPI F., FENILI D. -
Enzymatic determination of total serum cholesterol with the Vickers K-300 analyser.
Clin. Chem., 1976, 22, 690-691.

181. ZURKOWSKI P. -
A rapid method for cholesterol determination with a single reagent.
Clin. Chem., 1964, 10, 5, 451 - 453.

° °
°

Editions BERGERET 71-73, rue Leyteire 33000-BORDEAUX.
Tél. (56)91.12.59.

DEUXIÈME THÈSE

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE DIVERS CONSTITUANTS DE L'HUMEUR AQUEUSE